Untersuchungen über das Vorkommen höher ungesättigter Fettsäuren im Pflanzenreich und deren Trennung durch präparative Gaschromatographie

BARBARA HELGA FRIEDRICH

1968

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546010_0011

Dissertations- und Fotodruck Franz Frank
8 München 13, Zieblandstr. 39, Tel. 597 397

Untersuchungen über das Vorkommen höher ungesättigter Fettsäuren im Pflanzenreich und deren Trennung durch präparative Gaschromatographie

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt

von

Barbara Helga Friedrich

aus

Roßhaupten/Allgäu

März 1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Berichterstatter: Professor Dr. H. W a g n e r

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Mai 1968

INHALTSÜBERSICHT

Seite

EINLEITUNG 1

ALLGEMEINER TEIL 3

A. Polyenfettsäuren in niederen Pflanzen 8

I. Flechten 8

II. Moose 11

III. Farne und Pteridophyten 19

IV. Cycadeen und Coniferen 25

V. Fettsäureanalyse von Wasserpflanzen und Pflanzen mit feuchten Standorten 27

B. I. Tetraenfettsäure bei Boraginaceen und Labiaten 33

II. Labiaten 38

C. I. Reinigung einer Linolensäure des Handels durch präparative Gaschromatographie 47

II.a. Präparative Trennung von Δ 5,8,11,14-eicosatetraen- und Δ 5,8,11,14,17-eicosapentaensäure . 49

b. Präparative gaschromatographische Trennung eines natürlichen Gemisches einer Δ 5,8,11,14-eicosatetraen- und einer Δ 5,8,11,14,17-eicosapentaensäure 53

III. Präparative gaschromatographische Trennungen von Linolsäure und Linolensäure in unterschiedlichem Mischungsverhältnis bei konstanter Säulentemperatur 57

IV. Präparative GC-Trennung eines natürlichen Gemisches von $C_{18}(2=)$ und $C_{18}(3=)$-Fettsäuren . . 65

V. Überprüfung des Substanzverlustes bei der qualitativen Gaschromatographie 67

EXPERIMENTELLER TEIL 72

I. Isolierung der Fettstoffe aus den Samen 72

II. Aufarbeiten des Rohextraktes 72

III. Isolierung der Gesamtlipoide aus grünen Pflanzen oder grünen Pflanzenteilen 77

IV. Präparative Gaschromatographie 80

V. Gaschromatographie einer radioaktiven Fettsäure . 81

VI. Radioaktivitätsmessung 83

LITERATURVERZEICHNIS 84

E I N L E I T U N G

Nach den bisher in unserem Arbeitskreis durchgeführten Untersuchungen, kommen bei den Landpflanzen vorwiegend Fettsäuren mit 16- bzw. 18-C-Atomen und 1-3 Doppelbindungen vor, während die Algen und Phytoflagellaten auch höher ungesättigte Fettsäuren mit 20-C-Atomen und 4 und 5 Doppelbindungen enthalten. Im Gegensatz zu den Algen sind die Landpflanzen in der Regel also nicht fähig, höher ungesättigte C_{18}- und C_{20}-Fettsäuren ($C_{18}(4=)$, $C_{20}(4=)$, $C_{20}(5=)$) zu bilden. Alle diese Fettsäuren gehören auf Grund ihrer Strukturen zu den sogenannten vier "Fettsäure-Familien" vom Palmitolein-Öl-Linol- und Linolensäuretyp. Nur in einigen Landpflanzen, wie z.B. in Parinarium laurinum L., Impatiens balsamina L., Nymphaea alba L. und verschiedenen Iris-Arten: Iris pseudacorus L., Iris sibirica L., Iris graminea L., war schon früher eine $C_{18}(4=)$-Säure (Parinasäure) gefunden worden, die zu keinem der oben erwähnten Fettsäuretypen gehört und deshalb eine Ausnahme darstellt. Nach diesen Untersuchungen sollte man daher annehmen, daß vor allem die in der Evolution an die Algen sich anschließenden, niederen Landpflanzen im Gegensatz zu den höher entwickelten Landpflanzen noch in geringerem Maße zur Synthese von Polyenfettsäuren befähigt sind. Biotaxonomisch interessant war in diesem Zusammenhang die ebenfalls in unserem Arbeitskreis gemachte Entdeckung, daß die Boraginacee Lithospermum eine Δ 6,9,12,15-Octadecatetraensäure enthält. Diese gehört im Gegensatz zur Parinarsäure dem Linolensäuretyp an und besitzt essentiellen Charakter.

Aus diesen Ergebnissen ergaben sich folgende weitere Aufgaben:

1. Die Suche nach höher ungesättigten Fettsäuren in niederen Landpflanzen, um Anhaltspunkte zu gewinnen, welchen Weg die evolutionäre Entwicklung der ungesättigten Fettsäuren beim Übergang von den Algen zu den höheren Landpflanzen genommen haben könnte. Diese Arbeiten sind im Kapitel A zusammengefaßt.

2. Die Untersuchung anderer Vertreter der Boraginaceen und der mit ihr verwandten Labiatenfamilie auf das Vorkommen der für diese Familie ungewöhnlichen C_{18}-Tetraensäure, um Auskunft darüber zu erhalten, ob dieser ungesättigten Fettsäure Art- oder Familien-Spezifität zukommt (Kapitel B).

   Im Verlauf der Arbeit erwies es sich als nötig, die Methoden der Polyenfettsäuretrennung zu verbessern, da die Isolierung der in Boraginaceen vorkommenden C_{18}-Tetraensäure auf üblichem Weg nicht befriedigend gelöst werden konnte. Zur Lösung dieser Aufgabe bot sich die präparative Gaschromatographie an.

A L L G E M E I N E R T E I L

Isolierung und Analyse der ungesättigten Fettsäuremethylester

Da bei der Untersuchung der im Kapitel A und B angeführten Pflanzen im wesentlichen die gleiche Methodik angewendet wurde, wird im folgenden ein kurzer Überblick über die von uns durchgeführten Verfahren gegeben, auf die dann an den entsprechenden Stellen nur noch zurückverwiesen wird.

Isolierung der ungesättigten Fettsäuren

Das vorliegende Pflanzenmaterial wurde zerkleinert und erschöpfend mit Methanol-Chloroform (2:1) am Rückfluß extrahiert. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde der erhaltene Rohextrakt mit 5%iger methanolischer Kalilauge verseift. Nach Abtrennen des unverseifbaren Anteils mit Petroläther erhielten wir durch Ansäuern und Ausschütteln mit Benzin die Gesamtfettsäuren. Diese und alle folgenden Arbeiten wurden soweit möglich in Stickstoffatmosphäre ausgeführt. Von den erhaltenen Gesamtfettsäuren trennten wir durch Tiefkühlfraktionierung bei $-25^{\circ}C$ aus Aceton die gesättigten Fettsäuren ab, die zurückbleibenden ungesättigten Fettsäuren wurden mit Diazomethan methyliert.

Da Chlorophyll und andere Farbstoffe die nachfolgende Untersuchung der Extrakte stark stören, wurde ein geeignetes Verfahren zur Abtrennung dieser Begleitstoffe entwickelt. Wir chromatographierten die Fettsäureester auf einer Kieselgelsäule und verwendeten eine Mischung von Benzin-Benzol (1:1) als Elutionsmittel. Chlorophyll und alle anderen Farbstoffe wurden am Anfang der Säule absorbiert und konnten auf diese Weise vollständig entfernt werden.

Analysengang für die isolierten ungesättigten Fettsäuremethylester

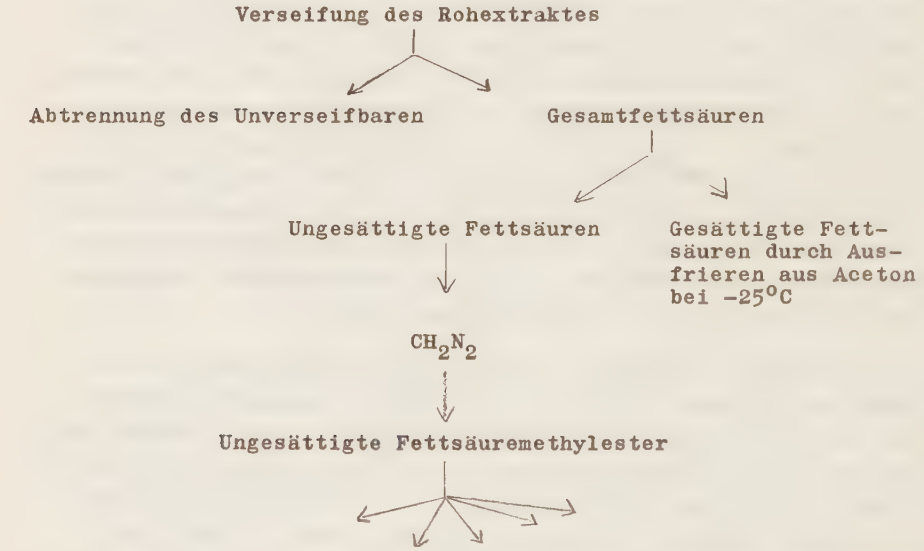
Die d ü n n s c h i c h t c h r o m a t o g r a p h i s c h e

Voruntersuchung erfolgte auf paraffinierten Kieselgurplatten im Laufmittelsystem Ameisensäure-Acetonitril-Aceton (2:2:1). Die aufgetrennten Substanzen wurden nach dem Abdunsten des Laufmittels in einer Osmiumtetroxidkammer angefärbt.

Die Chromatographie gestattet eine ungefähre Vorhersage über Menge, Zahl und Kettenlänge der in dem Gemisch vorliegenden Fettsäuren.

Isolierungs- und Analysengang

Extraktion mit Methanol-Chloroform (2:1)



Zur näheren Charakterisierung der Fettsäuren, besonders hinsichtlich der Zahl der Doppelbindungen wurde ein Teil der ungesättigten Fettsäureester nach der Methode von JANTZEN und ANDREAS[1] durch Behandlung mit Quecksilber-II-Acetat in methanolischer Lösung in ihre Quecksilber-Addukte überführt. Die Trennung erfolgte aufsteigend auf Kieselgur-Kieselgelplatten (Verhältnis 7:3) im Laufmittelsystem Isobutanol-Ameisensäure-Wasser (100:0.5:15.7)[2]. Die Platten wurden durch Besprühen mit isobutanolischer Diphenylcarbazonlösung entwickelt und dann ausgewertet.

Um die Zahl der Doppelbindungen zu bestimmen, werden zunächst die Mischung aller ungesättigter Fettsäureester und dann die regenerierten Einzelester der Alkaliisomerisation unterworfen. Wir führten diese nach der Vorschrift von HOLMAN und HAYES[3] im Mikromaßstab durch. Die Zeitdauer betrug 2 Min., wenn es sich um Pentaensäuren, und 20 Min., wenn es sich um Dien-, Trien- oder Tetraensäuren handelte. Die Absorptionsmaxima für Tetraensäuren liegen bei 300 und 314 mμ, für Pentaensäuren bei 329 und 346 mμ. Die Gewinnung der Einzelester erfolgte, indem die Zonen der Einzel-Addukte aus der Dünnschichtplatte isoliert und dann durch Spaltung der Addukte mit verdünnter Salzsäure die Ester in Freiheit gesetzt wurden.

Die folgenden Abkürzungen wurden verwendet:

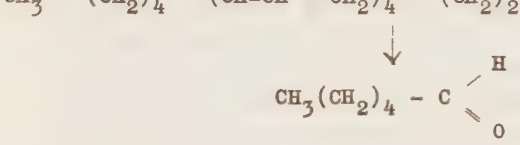
DC = Dünnschichtchromatographie
GC = Gaschromatographie
FS = Fettsäuren
Hg-Add. = Quecksilber-II-Acetataddukte der Methylester der ungesättigten Fettsäuren

Die gaschromatographische Analyse der Methylester der Fettsäuregemische wurde auf EGSSX-Säulen bei einer Säulentemperatur von 175°C durchgeführt. Als Trägergas diente Argon.

Die H y d r i e r u n g diente zur Bestimmung der Kettenlänge. Die aus der Platte isolierten und regenerierten Einzelester wurden mit Platinoxid als Katalysator im Mikroverfahren hydriert und die erhaltenen gesättigten Fettsäureester der gaschromatographischen Analyse unterworfen. Der Vergleich der Retentionszeiten mit denen der Testfettsäureester gestattet eine eindeutige Identifizierung.

Zur Bestimmung der Doppelbindungen in den Fettsäuremethylestern und damit ihrer exakten Struktur wurden ein r e d u k t i v e r und ein o x y d a t i v e r A b b a u durchgeführt.

Durch den reduktiven Abbau wird das Methylende in Form eines Aldehyds erfaßt. So erhält man z.B. im Falle der Δ 5,8,11,14-Eicosatetraensäure (Arachidonsäure) den Capronaldehyd.



Der Nachweis des gebildeten Aldehyds gelingt durch Darstellung des Hydrazons und anschließende Chromatographie auf Kieselgelplatten im System Benzol-Benzin (75:25). Wir führten diese Reaktion nach der Vorschrift von PRIVETT[4] aus.

Durch den o x y d a t i v e n A b b a u werden alle Fettsäurebruchstücke erfaßt. Das Methylende wird als Monocarbonsäure, das Carboxylende als Dicarbonsäure und die CH_2-Bruchstücke als Malonsäure erfaßt. Die Oxydation verläuft über die Ozonide, deren Spaltprodukte in die entsprechenden Säuren umgewandelt werden[5]. Die erhaltenen und anschließend mit Diazomethan methylierten Säuren wurden gaschromatographisch auf Apiezonsäulen analysiert.

Die Arachidonsäure liefert hierbei folgende Spaltprodukte:

$CH_3 - (CH_2)_4 - (CH = CH - CH_2)_4 - (CH_2)_2 - COOH \longrightarrow$

$CH_3 - (CH_2)_4 - COOH$ Capronsäure

$+ 3\ COOH - CH_2 - COOH$ Malonsäure

$+ COOH - (CH_2)_3 - COOH$ Glutarsäure

A. Polyenfettsäuren in niederen Pflanzen

I. Flechten

Zur Untersuchung kamen die Flechten: Parmelia physodes (L.) Ach.; Parmelia furfuracea (L.) Ach.; Cetraria islandica (L.) Ach.; Usnea barbata (L.) Wigg.

Parmelia physodes, eine Schüsselflechte und Usnea barbata, eine Bartflechte, wachsen vorwiegend an Fichtenstämmen. Cetraria islandica bezogen wir aus dem Drogenhandel. Von Parmelia furfuracea, ebenfalls einer Schüsselflechte, wurde ein Methanol-Chloroform-Extrakt untersucht, den uns die Fa. Keimdiät, Augsburg, lieferte.

Ein Vergleich der Quecksilberadduktchromatogramme mit denen einer Grünalge bekannter Fettsäurezusammensetzung lieferte in 3 Zonen gute Übereinstimmung. Es waren die Zonen I, III und IV. Nach der von POHL gegebenen Übersicht sollte es sich demnach um Monoen-, Dien- und Tetraensäuren handeln. Während die Zone II, vermutlich eine Triensäure, nur in Usnea barbata vorhanden war, ließen die Zonen im niedrigen R_f-Bereich bei allen Flechten keinen Zweifel, daß entweder eine C_{18}- oder eine C_{20}-Tetraensäure vorhanden war Zone IV, Abb. 1, S. 9). Da bei der Alkaliisomerisierung ein Doppelpeak bei 300 und bei 314 mμ auftrat, sollte es sich hierbei um eine langkettige Tetraensäure handeln. Nach dem gaschromatographischen Vergleich mit einer aus Borraginaceen gewonnenen Tetraensäure mußte es eine C_{18}-Tetraensäure sein. Die Retentionszeiten sprachen ziemlich eindeutig für eine $\triangle$ 6,9,12,15-Octadecatetraensäure (Abb. 2, S.10).

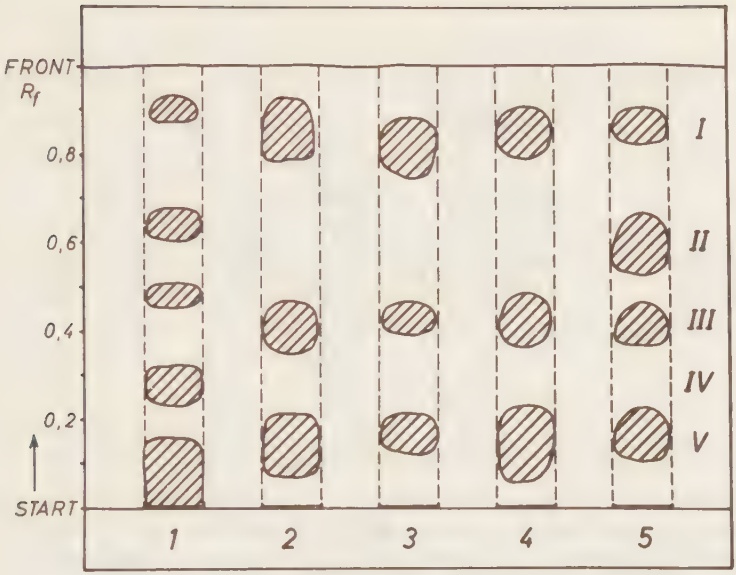


Abb. 1

DC der FS-Quecksilber-Addukte

von

1 = Alge(Halimeda tuna)

2 = Cetraria islandica

3 = Parmelia physodes

4 = Moos (Rhytidiadelphus triquetrus)

5 = Usnea barbata

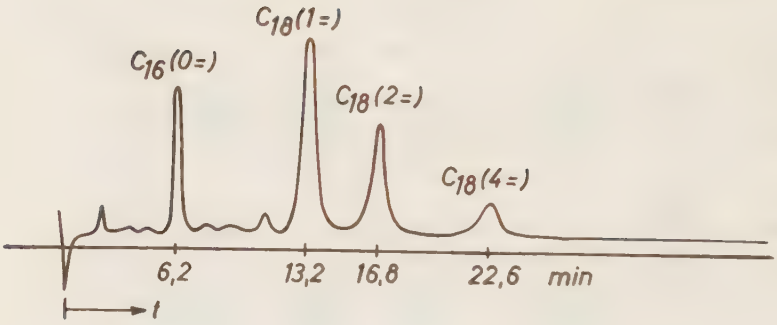


Abb. 2

GC von Cetraria islandica

In Abb. 2 ist das Gaschromatogramm der Flechte Cetraria islandica wiedergegeben, während die Tabelle 1 eine vergleichende Übersicht über das gaschromatographische Ergebnis bei allen weiteren Flechten-FS gibt. Demnach enthielten nur Usnea barbata, Cetraria islandica und Parmelia physodes eine C_{18}-Tetraensäure, wobei das Vorkommen in Cetraria mengenmäßig am größten war.

T a b e l l e 1

Flechten	Fettsäuren			
Usnea barbata	$C_{16}(2=)$	$C_{16}(3=)$	$C_{18}(2=)$	$C_{18}(4=)$
Parmelia furfuracea	$C_{18}(1=)$	$C_{18}(2=)$	$C_{18}(3=)$ wenig	
Cetraria islandica	$C_{18}(1=)$ 54.73%	$C_{18}(2=)$ 35.57%	$C_{18}(4=)$ 9.63%	
Parmelia physodes	$C_{16}(1=)$ wenig	$C_{18}(1=)$	$C_{18}(2=)$	$C_{18}(4=)$ wenig

II. Moose

Ausgewählt wurden für die Untersuchung Rhytidiadelphus triquetrus L. ap. Hedw., Polytrichum commune L. und Fegatella Raddi, ein Lebermoos, das im Botanischen Garten in München gesammelt worden war. Rhytidiadelphus gehört zur Ordnung der Hypnales und der Familie der Rhytidiaceae, Polytrichum commune zur Ordnung der Bryales und Familie der Polytrichaceae. Rh. tr. wurde im Stubaital im Herbst gesammelt. Das Moos fühlte sich schon nach dem Sammeln trocken an und wurde ohne weitere Trocknung zerkleinert und extrahiert vgl. S. 4 Die anderen Moose wurden durch Waschen von anhaftender Erde befreit und dann nach kurzem Abtrocknen als Ganzes mit den Rhizoiden extrahiert.

Zur Voruntersuchung chromatographierten wir zunächst die Fettsäuremethylester auf paraffinierten Dünnschichtplatten. Demnach war mit dem Vorliegen von Monoen-, Dien- und Trien- und sehr wahrscheinlich auch höher ungesättigten Fettsäuren zu rechnen.

Die hergestellten Quecksilberaddukte wurden, wie Abb. 3, S.12, zeigt, wieder mit den Addukten einer Alge bekannter Fettsäurezusammensetzung aufgetragen und die nach dem Entwickeln auftretenden Zonen verglichen. Die Lage der Zonen sprach neben Monoen-, Dien- und Trien- für Tetraen- und Pentaenfettsäuren im Gemisch. Die Gaschromatographie (Abb. 4, S.13), Alkaliisomerisierung und Hydrierung der Gemische bestätigten das Vorhandensein einer C_{20}-Tetraen- und C_{20}-Pentaensäure. Zur Hydrierung wurden die dünnschichtchromatographisch aufgetrennten und wieder regenerierten Fettsäureester verwendet und anschließend gaschromatographisch als gesättigte Ester bestimmt. Abb. 5, S.13, gibt die Alkaliisomerisierungskurve von Rhytidiadelphus triquetrus wieder. In Tab. 2, S. 14, sind die in Rhytidiadelphus gefundenen Säuren und deren prozentuale Zusammensetzung angegeben. Es überwiegen dabei die C_{16}- und C_{18}-Säuren.

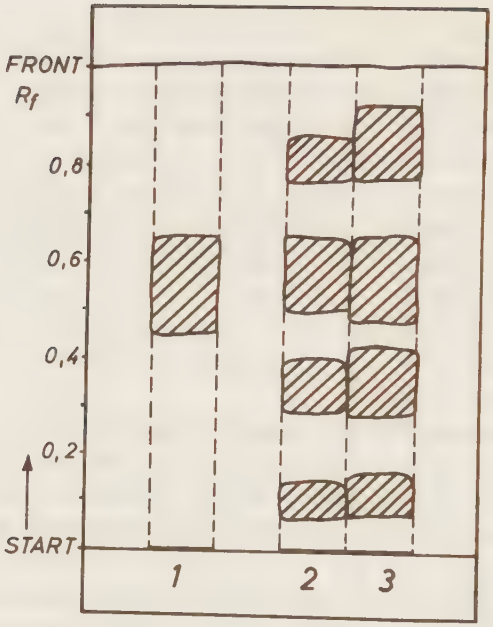


Abb. 3

DC der Quecksilber-Addukte

1 = Arachidonsäure-Addukt
2 = Moos (Rhytidiadelphus triquetrus)
3 = Alge (Halimeda tuna)

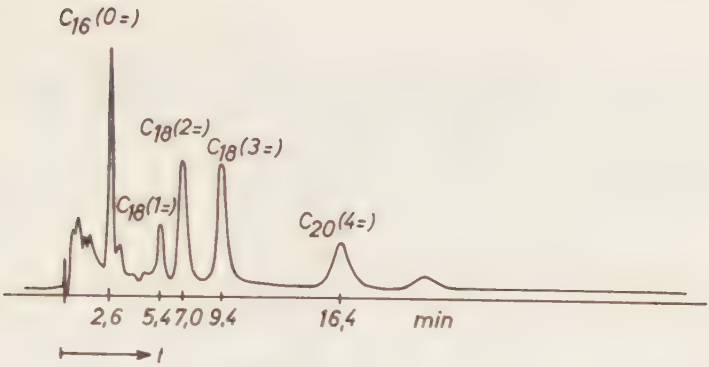


Abb. 4
GC von Rhytidiadelphus triquetrus

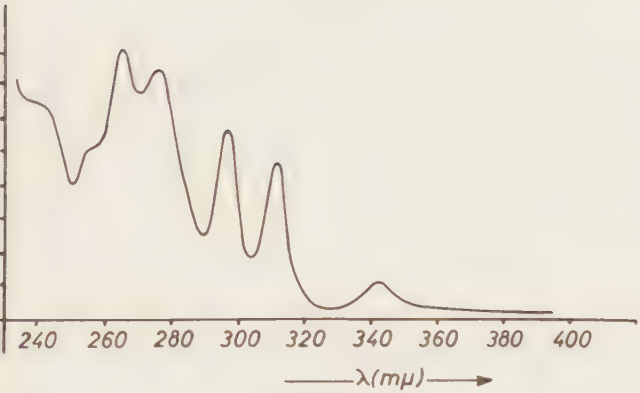


Abb. 5/I
UV-Alkaliisomerisierungskurve der ungesättigten Fettsäureester von Rhytidiadelph.triq.

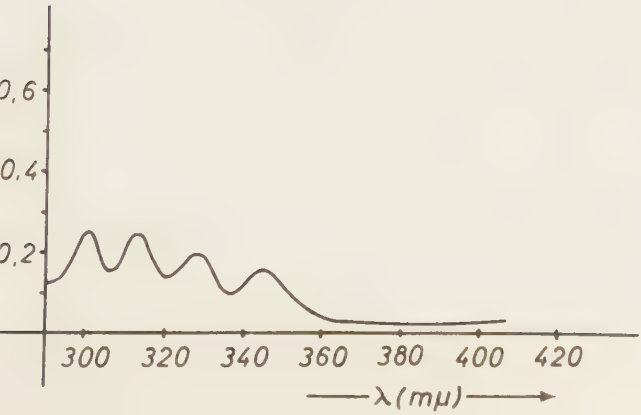


Abb. 5/II
UV-Alkaliisomerisierungskurve der aus den gesamten ungesättigten FS-Ester von Rhytidiadelphus triquetrus isolierten Tetraensäure

Tabelle 2

Prozentuale Zusammensetzung der Fettsäuren von Rhytid.triq.	
$C_{16}(0=)$	13.46%
unbekannte Säuren	21.13%
$C_{18}(1=)$	6.3%
$C_{18}(2=)$	18.12%
$C_{18}(3=)$ γ	23.24%
$C_{20}(4=)$	14.24%
$C_{20}(5=)$	3.48%

Polytrichum commune, das gemeine Widertonmoos (Haarmützenmoos) wurde nur chromatographisch geprüft. Nach dem Hg-Add.-Chromatogramm herrscht fast völlige Übereinstimmung mit Rhytidiadelphus. Auf dem Chromatogramm Abb. 6, S. 15, waren, wie der R_f-Wert-Vergleich der Quecksilberaddukte (Tab. 3) der beiden Moose zeigt, die gleichen Monoen-, Dien-, Trien-, Tetraen- und Pentaen-Fettsäuren enthalten.

Tabelle 3

R_f-Werte der FS-Quecksilberaddukte auf Kieselgel-Kieselgur im Laufmittelsystem Isobutanol-Ameisensäure-Wasser (100:0.5:15.7)

Polytrichum commune	Rhytidiadelphus
0.15	0.16
0.29	0.3
0.41	0.42
0.6	0.6

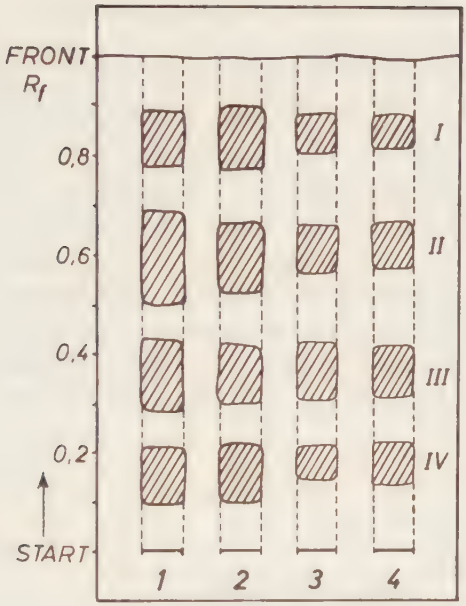


Abb. 6

DC der Quecksilber-Addukte

1 = Polytrichum commune
2 = Rhytidiadelphus triquetrus

e g a t e l l a untersuchten wir ebenfalls nur dünnschicht-
hromatographisch. Die Aufarbeitung des Rohextraktes erfolgte,
ie sie bei Rhytidiadelphus beschrieben ist. Neben C_{16}-Säuren,
$_{18}$(1=), C_{18}(2=) wenig C_{18}(3=) war auch wie in den Laubmoosen
ine C_{20}(4=)-Fettsäure enthalten.

Strukturaufklärung einer isolierten C_{20}-Tetraensäure

Da die gaschromatographische Analyse der C_{20}-Tetraensäure aus dem Laubmoos Rhytidiadelphus triquetrus nicht exakt anzugeben vermag, ob tatsächlich die vermutete Δ 5,8,11,14-C_{20}-Tetraensäure vorlag, führten wir einen oxydativen und einen reduktiven Abbau durch. Zu diesem Zweck wurden die Methylester der Fettsäuren nach der beschriebenen Methode in die Quecksilber-II-Acetat-Addukte übergeführt. Auf 10 Kieselgel-Kieselgur-Platten wurden die Addukte im Laufmittelsystem Isobutanol-Ameisensäure-Wasser aufgetrennt und die Zonen mit der Tetraensäure isoliert. Wie die Dünnschicht- und Gaschromatographie (Abb. 7) bestätigte, war es auf diesem Wege gelungen, eine reine C_{20}-Säure zu erhalten.

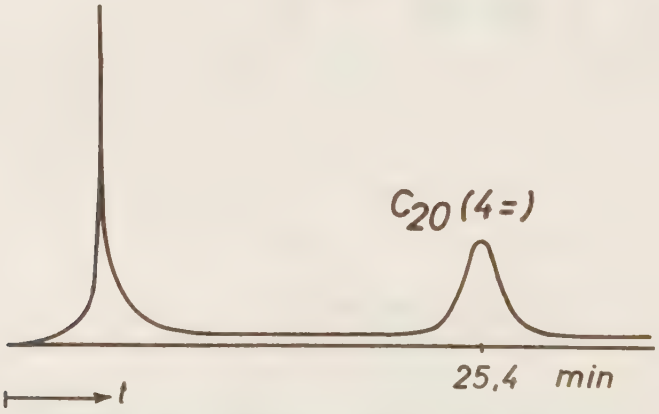


Abb. 7

GC der isolierten C_{20}-Tetraensäure

Retentionszeit: 18.8

4 mg isolierten C_{20}-Tetraensäuremethylester unterwarfen wir der reduktiven Ozonolyse. Hierbei wurde die Substanz zunächst bei -65° im Trockeneisbad ozonisiert und anschließend mit Lindlar-

Katalysator reduziert. Zur Identifizierung des erhaltenen Aldehyds setzten wir mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin um und chromatographierten das Reaktionsprodukt auf Kieselgelplatten im Laufmittel Benzol-Benzin (75:25). Es war ein starker Hydrazon-Fleck bei R_f 0.45 entstanden, der mit der Testsubstanz übereinstimmte. Bei zwei schwächer gefärbten Flecken mit tieferem R_f-Wert dürfte es sich um Begleitstoffe des Reagenzes handeln.

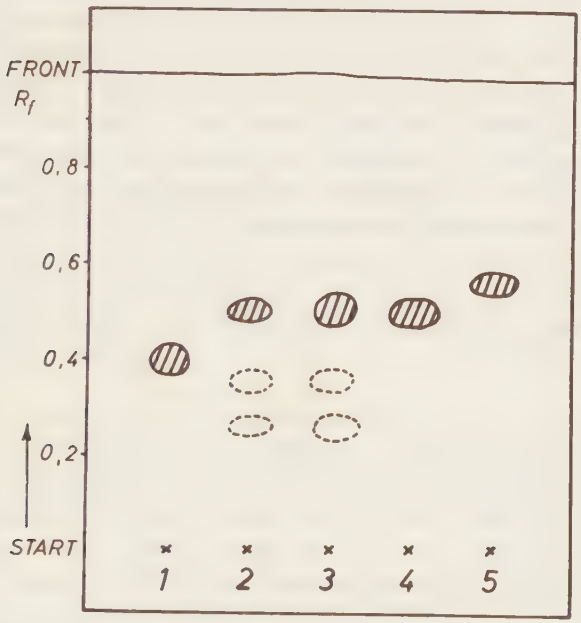


Abb. 8

DC der Hydrazone

1 = Butyraldehyd-Phenyl-Hydrazon
2 = Hydrazon aus der abgebauten Arachidonsäure
3 = Hydrazon aus der abgebauten Substanz
4 = Capronaldehyd-Phenyl-Hydrazon
5 = Octaldehyd-Phenyl-Hydrazon

Um auch die Bruchstücke des Carboxylendes zu erhalten, führten wir mit der isolierten $C_{20}(4=)$-Säure nach der Vorschrift von KLENK-BONGARD[5] einen oxydativen Ozonidabbau durch. Die bei $0^{o}C$ ozonisierte Substanz wurde in Methylacetat und Eisessig aufgenommen und 40 Stdn. auf $35^{o}C$ erwärmt, wobei das Ozonid zunächst gespalten und die Spaltprodukte zu den entsprechenden Säuren (Mono- und Dicarbonsäuren vgl. S. 7) aufoxydiert wurden. Nach dem Methylieren der Abbausäuren erfolgte die Gaschromatographie auf EGSSX-Säulen. In der Hauptmenge waren Capron- und Glutarsäure gebildet worden. Daneben sind nicht genau zu definierende Spaltprodukte entstanden. Die für Arachidonsäure geforderten Stellungen der Doppelbindungen in den Positionen 5,8,11,14 waren eindeutig durch das Auftreten der Capron- und Glutarsäure bewiesen. Glutarsäure, eine Dicarbonsäure mit 5-C-Atomen, stammt vom Carboxylende, Capronsäure, eine Monocarbonsäure mit 6-C-Atomen, vom Methylende (vgl. S. 7).

III. Farne und Pteridophyten

Die Fettsäureanalyse wurde mit dem Blattmaterial der beiden Farnarten Dryopteris filix mas L., Pteridium aquilinum Kuhn und den Sporen von Lycopodium clavatum L., einem Vertreter der Bärlapp_ gewächse, durchgeführt.

Dryopteris filix mas L.

Die Wurzelstöcke wurden als getrocknete Droge aus dem Drogenhandel bezogen und nach dem angegebenen Schema extrahiert. Das Chromatogramm der Quecksilber-Addukte, vgl. Abb. 9, S.20, lieferte bereits die ersten Anhaltspunkte für das Vorliegen von Monoen-, Dien-, Trien-, einer Tetraen- und vermutlich auch einer Pentaensäure. Mit Hilfe des Gaschromatogramms (Abb. 10, S.20) konnte die eine Säure durch Vergleich der Retentionszeiten mit einer Testarachidonsäure als C_{20} Δ 5, 8,11,14-Tetraensäure identifiziert werden, nachdem die Alkaliisomerisierung durch das Auftreten eines Doppelpeaks bei 300 und 314 mμ das Vorliegen einer Tetraensäure bereits bestätigt hatte.

Eine Pentaensäure war dagegen nur noch in Spuren nachweisbar. Die quantitative Verteilung der anderen ungesättigten Fettsäuren war, wie aus Tab. 4, S. 22, hervorgeht, folgende: Ölsäure 14.7%, Linolsäure 29.2%, Linolensäure 12.1%, Arachidonsäure 20.2%. Trotz der langen Lagerung kam die Tetraenfettsäure in der hohen Konzentration von 20.2% vor.

Eine zum Vergleich mit frischen Rhizomen von Dryopteris filix mas durchgeführte Analyse brachte kein anderes Ergebnis. Verschieden davon war dagegen die Fettsäureanalyse eines methanolischen Filix-Extraktes, den die Fa. Helfenberg, Wewelinghofen, Krs. Düsseldorf, zur Verfügung stellte. In dem Extrakt waren neben Öl-, Linol- nur noch Linolensäure enthalten.

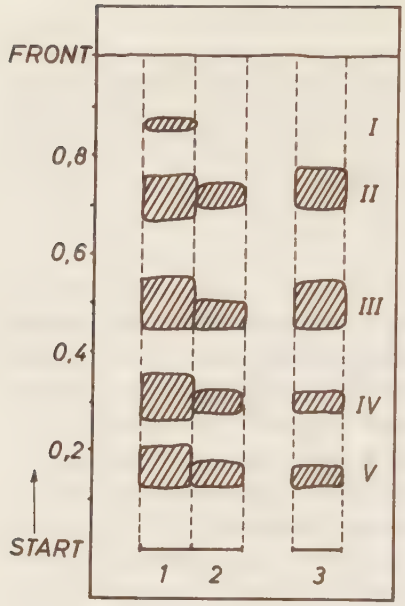


Abb. 9
DC der Quecksilber-Addukte

1 = Alge (Halimeda tuna)
2 = Rhiz. Filicis
3 = Rhiz. Filicis

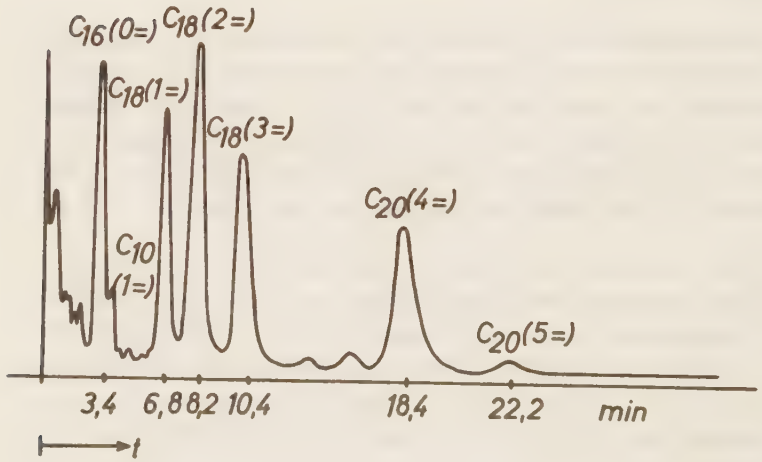


Abb. 10

GC der ungesättigten FS-Methylester von Pteridium aquilinum

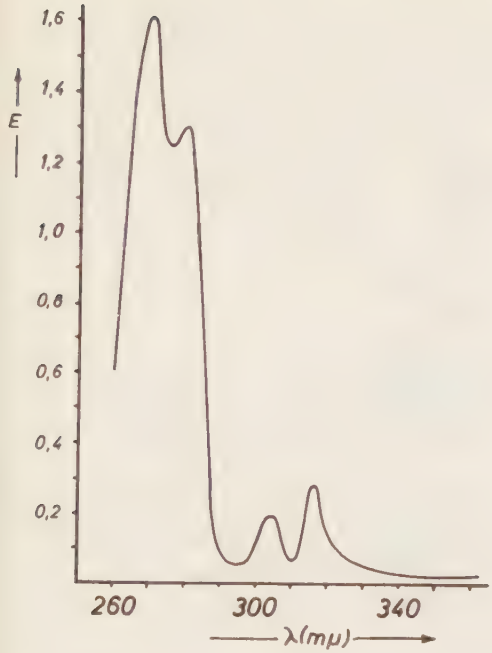


Abb. 11

UV-Alkaliisomerisierungskurve der ungesättigten FSE von Dryopteris filix mas

Für die Untersuchungen an Pteridium aquilinum verwendeten wir frische Rhizome, die nach der Säuberung nur kurze Zeit an der Luft getrocknet, sofort zerkleinert und extrahiert wurden. Schon aus den Gaschromatogrammen der Ester und Addukte konnte das Vorhandensein einer Tetraensäure abgelesen werden. Bei der gaschromatographischen Analyse wurde diese durch Vergleich mit einer Testsubstanz als $C_{20}(4=)$-Säure identifiziert. Beim Mischen des isolierten Tetraensäureesters mit Arachidonsäureester im Gaschromatographen trat eine Peakerhöhung ein, womit die Säure einwandfrei als Δ 5,8,11,14-C_{20}-Tetraensäure identifiziert werden konnte.

Tabelle 4

Prozentuale Zusammensetzung der ungesättigten Fettsäuren von Dryopteris filix mas

unbekannte Fettsäuren	$C_{16}(0=)$	$C_{16}(1=)$	$C_{18}(1=)$	$C_{18}(2=)$	$C_{18}(3=)$	$C_{20}(4=)$
16.71%	3.46%	3.46%	14.74%	29.21%	12.17%	20.22%

Lycopodium clavatum L.

Bei der Untersuchung von Lycopodium bearbeiteten wir das im Drogenhandel unter dem Namen L y c o p o d i u m gehandelte frische Sporenmaterial und ein etwa 2 - 3 Jahre gelagertes.

Dabei zeigte sich, daß die Lagerung großen Einfluß auf den Gehalt an Polyenfettsäuren hat. In der alten Droge waren diese nicht mehr enthalten. Mit Hilfe des Gaschromatogrammes vgl. Abb. 13, S. 23, konnten folgende Fettsäuren gefunden werden. Ihre prozentuale Zusammensetzung gibt die Tabelle 5 wieder. $C_{14}(0=)$, $C_{16}(0=)$, $C_{16}(1=)$, $C_{18}(2=)$, $C_{18}(3=)$ und $C_{20}(4=)$, allerdings nur in kleiner Menge. Die Identifizierung gelang durch Vergleich der Retentionszeiten mit Testsubstanzen.

Tabelle 5

Prozentuale FS-Zusammensetzung von Lycopodium clavatum

$C_{14}(0=)$	$C_{16}(0=)$	$C_{16}(1=)$	$C_{16}(3=)$	$C_{18}(1=)$	$C_{18}(2=)$	$C_{18}(3=)$ 9,12,15	$C_{20}(4=$ 5,8, 11,14
1.4%	10.1%	7.7%	5.0%	24.2%	41.9%	5.0%	4.7%

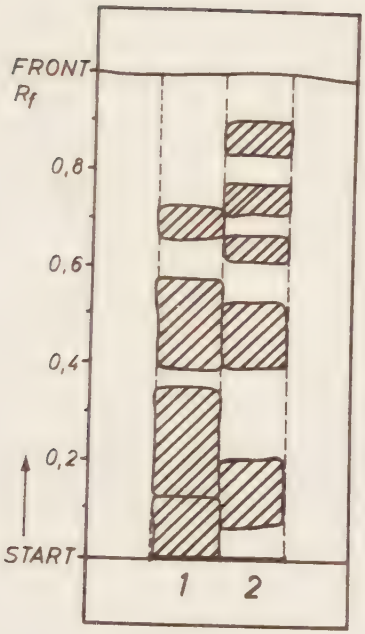


Abb. 12

DC der Quecksilber-Addukte von Lycopodium clavatum L.

1 = Alge (Halimeda tuna)
2 = Lycopodium

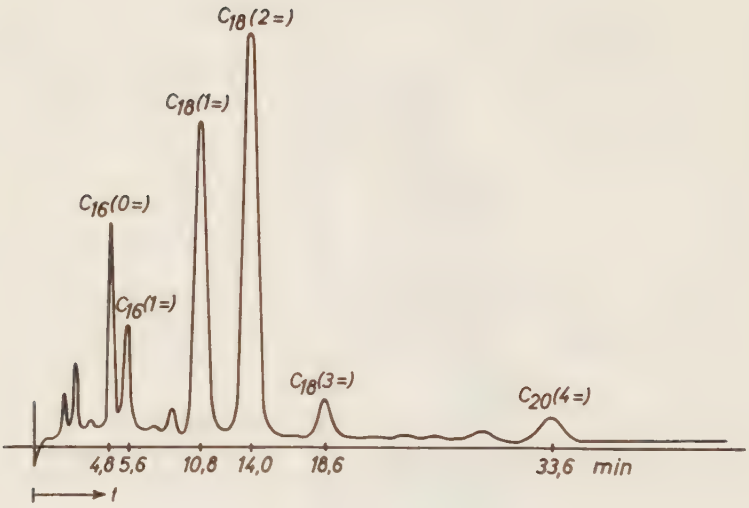


Abb. 13

GC der FS-Methylester von Lycopodium clavatum L.

IV. Cycadeen und Coniferen

Bei Cyas revoluta L. handelt es sich um einen Vertreter der Familie der Cycadaceae, Klasse der Cycadinae. Untersucht wurde das Samenfett*). Die walnußgroßen, harten Samen wurden zerschlagen und dann das zerkleinerte fette Endosperm der Extraktion unterworfen. Bei der chromatographischen Prüfung der ungesättigten Fettsäuremethylester konnten neben C_{18}(1=) 4.2%, C_{18}(2=) 33.9%, C_{18}(3=) 38.4% kleine Mengen einer C_{18}-Tetraensäure identifiziert werden.

Als Vertreter der Gymnospermae wählten wir für unsere Prüfungen Picea excelsa. Da die Samen die fettreichsten Organe der Pflanzen sind, wurden diese für die Arbeiten verwendet. Frisch gefallene Fichtenzapfen wurden bei mäßiger Wärme getrocknet. Die ausgestreuten Samen wurden in gemahlenem Zustand extrahiert. Die in den Samen enthaltenen Fettsäuren wurden dünnschicht- und gaschromatographisch untersucht, wobei sich keine Hinweise auf das Vorhandensein einer C_{20} (4=)-Fettsäure zeigten. Die Alkaliisomerisierung bewies endgültig die Abwesenheit einer Tetraensäure. Die Samen von Picea excelsa enthalten somit nur C_{18}(1=), C_{18}(2=) und C_{18}(3=)-Säuren.

*) Die Droge lieferte die Fa. Albert Schenkel, Hamburg-Blankenese.

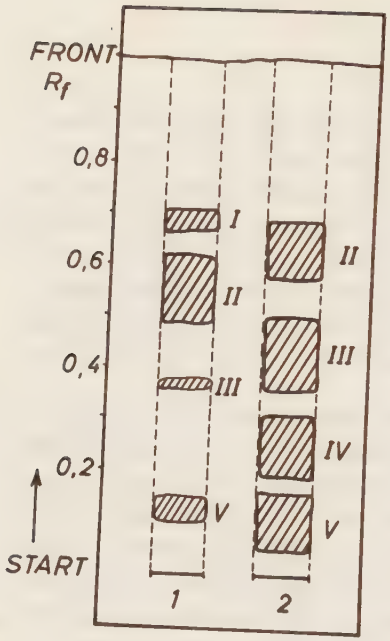


Abb. 14

DC der Quecksilber-Addukte

1 = Samen von Picea excelsa
2 = Alge

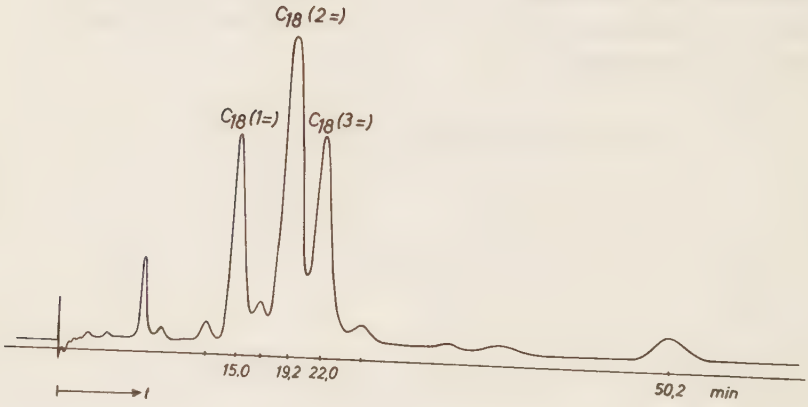


Abb. 15

GC der FS-Ester von Picea excelsa Lam.

V. Fettsäureanalyse von Wasserpflanzen und Pflanzen mit feuchten Standorten

Nachdem KAUFMANN[6] gefunden hatte, daß in den Samen einiger Pflanzen mit erhöhtem Wasserbedarf (verschiedene Iris-Arten) eine C_{18}-Tetraensäure enthalten ist, prüften wir die Samenfette anderer Pflanzen, die feuchte Standorte bevorzugen. Für eine eingehende Analyse stand uns das Samenmaterial folgender Pflanzen zur Verfügung: Scirpus lacustris L. Fam. Cyperaceae, Ordg. Cyperales, Typha minima Funk und Typha latifolia L. Fam. Typhaceae, Ordg. Spadiciflorae, Alisma aquatica L. Fam. Alismataceae, Ordg. Helobiae und Marsilea quadrifolia L., Fam. Marsiliacea Unterklasse Hydropterides. Sie gehören systematisch, außer Marsilea, zu den Monocotyledonen, Marsilea ist ein Vertreter der Wasserfarne.

Die Aufarbeitung erfolgte wieder nach dem bekannten Schema. Auf dem Chromatogramm der Quecksilber-Addukte (Abb. 16,S.28) waren bei 2 Vertretern (Typha minima und Scirpus lac.) schwache Zonen bei R_f = 0.42 (Zone IV) zu erkennen, die eine C_{18}-Tetraensäure vermuten ließen. Die Alkaliisomerisierung bestätigte wiederum das Vorhandensein einer Fettsäure mit 4 Doppelbindungen. Gaschromatographisch ließ sich diese einwandfrei als eine $C_{18}(4=)$-Säure identifizieren. Im Vergleich zu den anderen Fettsäuren war sie mit 3.85% der Gesamtfettsäuren dagegen nur in sehr kleiner Menge enthalten (Abb. 17, S. 28). Die übrigen Fettsäuren brachten nichts Neues. Es waren nachweisbar $C_{16}(1=)$, $C_{18}(1=)$, $C_{18}(2=)$, $C_{18}(3=)$ und $C_{18}(4=)$-Säuren.

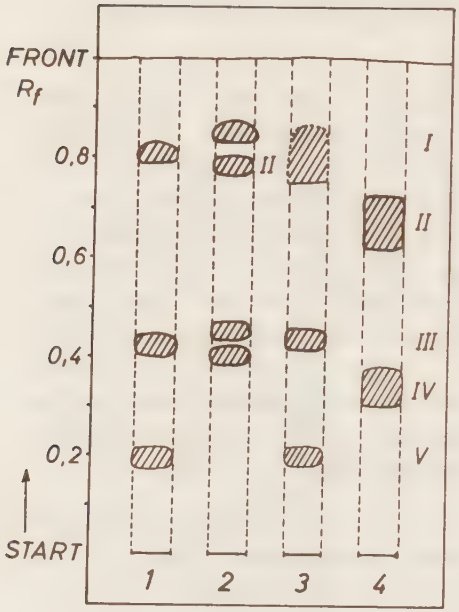


Abb. 16

DC der FS-Quecksilber-Addukte

1 = Typha minima
2 = Typha latifolia
3 = Scirpus lacustris
4 = Alisma aquatica

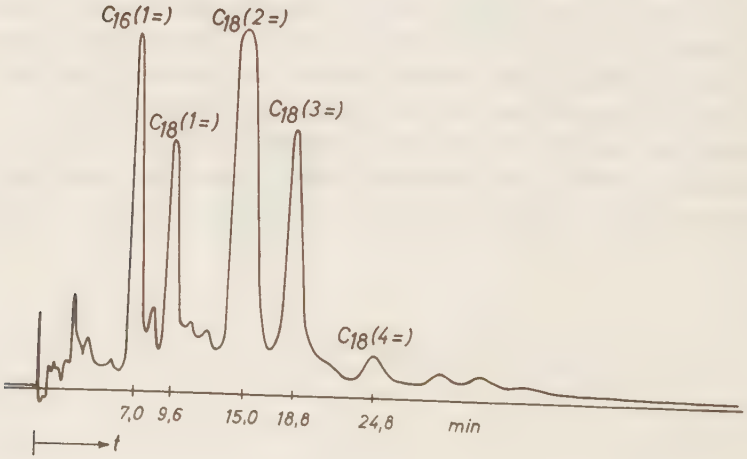


Abb. 17

GC der ungesättigten FS-Ester von Scirpus lacustris

Tabelle 6

FS-Zusammensetzung von einigen Pflanzen feuchter Standorte					
Scirpus lacustris L.	$C_{16}(1=)$	$C_{18}(1=)$	$C_{18}(2=)$	$C_{18}(3=)$	$C_{18}(4=)$
	15.92%	11.17%	49.6%	17.6%	3.85%
Typha minima Funk	$C_{16}(1=)$	$C_{18}(1=)$	$C_{18}(2=)$	$C_{18}(3=)$	$C_{18}(4=)$ sehr wenig
Typha latifolia L.	$C_{16}(0=)$	$C_{18}(1=)$	$C_{18}(2=)$	$C_{18}(3=)$	
Alisma aquatica L.	$C_{16}(0=)$	$C_{18}(1=)$	$C_{18}(2=)$	$C_{18}(3=)$	
Marsilia quadrifolia L.	enthält wenig C_{14}- und C_{16}-Säuren				

Während unserer Untersuchungen erschien eine Arbeit von SCHLENK-GELLERMANN[7], in der ebenfalls eine systematische Untersuchung bei Vertretern der Moose und Farne durchgeführt wurde. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen gelang es auch dieser Arbeitsgruppe in einer Reihe von Moosen, Farnen sowie im Bärlapp die Δ 5,8,11,14-Eicosatetraensäure nachzuweisen (Tab. 7, S. 30). In einigen Vertretern wurden auch eine Δ 5,8,11,14,17-Pentaensäure aufgefunden. Es waren dies Adiantum pedatum und Hylocomium splendens. Damit wurden unsere Befunde sowohl in qualitativer als auch in quantitativer Hinsicht im großen und ganzen bestätigt.

Bei zwei der von SCHLENK untersuchten Vertreter der Moose finden sich keine Angaben für das Vorkommen einer Pentaensäure. Abweichend von unseren Angaben konnten SCHLENK und Mitarb. in Lycopodium noch eine $C_{16}(3=)$-Säure nachweisen.

Tabelle 7

Übersicht über die von SCHLENK u.Mitarb.[7], sowie von uns untersuchten Pflanzen, in denen Arachidonsäure gefunden wurde

	$C_{20}(4=)\,\Delta\,5,8,11,14$
Polytrichum juniperum	9.3%
Hedwigia ciliata	14.9%
Hylocomium splendens	13.2%
Sphagnum	9.6%
Mnium cuspidatum	11.1%
Rhytidiadelphus triq.	14.24%
Pteridium aquilinum	20.22%
Lycopodium clavatum	2.2%
Adiantum pedatum	10.8%
Onoclea sensibilis	8.0%
Osmunda claytoniana	6.9%
Matteucia struthiopteris	8.2%

Interessant ist, daß unabhängig von uns auch SCHLENK und GELLERMANN beobachteten, daß sich Pflanzen feuchter Standorte durch eine etwas vom Normalen abweichende FS-Führung auszeichnen.

In Tab. 8, S. 31, ist eine zusammenfassende Übersicht über die FS-Zusammensetzung der von uns untersuchten Pflanzen gegeben. Sie beinhaltet Vertreter der Flechten, Moose, Farne, Cycadeen, Nadelhölzer, Rohrkolben, Riedgräser und Froschlöffelgewächse.

Tabelle 8

Übersicht über die FS-Zusammensetzung der von uns untersuchten Pflanzen

	ungesättigte Fettsäuren		
	C_{16}	C_{18}	C_{20}
I. Flechten			
1. Usnea barbata	2,3=	2,4=	-
2. Parme lia furfuracea	-	1,2,3=	-
3. Cetraria islandica	-	1,2,4=	-
4. Parmelia physodes	1=	1,2,4=	-
II. Moose			
1. Rhytidiadelphus triquetrus	-	1,2,3=	4,5=
2. Polytrichum commune	-	1,2,3=	4,5=
3. Fegatella	-	1,2,3=	4=
III. Farne u. Bärlappgewächse			
1. Dryopteris filix mas	1=	1,2,3=	4=
2. Pteridium aquilinum	1=	1,2,3=	4=
3. Lycopodium clavatum	1,3=	1,2,3=	4=
IV. Cycadeen			
1. Cycas revoluta	-	1,2,3,4=	-
V. Nadelhölzer			
1. Picea excelsa	-	1,2,3=	-
VI. Rohrkolben			
1. Typha minima	1=	1,2,3,4=	-
2. Typha latifolia	-	1,2,3=	-
VII. Riedgräser			
1. Scirpus lacustris	1=	1,2,3,4=	-
VIII. Froschlöffelgewächse			
1. Alisma aquatica	-	1,2,3=	-

Obwohl das bisher untersuchte Pflanzenmaterial noch nicht als repräsentativ gelten kann, erscheint es nach dieser von uns stichprobenartig durchgeführten Untersuchung sinnvoll, eine vergleichende Betrachtung über dies Vorkommen ungesättigter Fettsäuren in niederen Pflanzen anzustellen.

Wie bereits POHL[2] in einer früheren Arbeit feststellte, tritt beim Übergang von den Algen zu den Landpflanzen eine bemerkenswerte Änderung in der Fettsäuresynthese im Sinne einer allmählichen Rückbildung ein. Die Algen sind noch in der Lage, größere Mengen ungesättigter C_{20}- und C_{22}-Fettsäuren zu synthetisieren, während bei nahezu allen Landpflanzen die α-Linolensäure Δ 9,12, 15-C_{18}(3=)FS die höchst ungesättigte Fettsäure ist. Von großem Interesse sollte daher sein, ob auch bereits die niedersten Landpflanzen die Biosynthese der höher ungesättigten C_{18}- und C_{20}-Fettsäuren vollständig aufgegeben haben, oder ob sie diese Fettsäuren noch in geringen Mengen bilden. Wie unsere Untersuchungen, die in obiger Tabelle zusammengefaßt sind, zeigen, bilden die Flechten nur noch C_{18}- Säuren und keine C_{20}-Fettsäuren mehr; sie bilden jedoch bei den C_{18}-Fettsäuren die C_{18}-Tetraensäure. Bei den M o o s e n konnte eine C_{20}-Tetraen- und C_{20}-Pentaensäure in verhältnismäßig hoher Konzentration nachgewiesen werden. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß nach heutiger Ansicht die Moose einen Seitenzweig der pflanzlichen Evolution aus den Algen heraus darstellen, weshalb der große Gehalt an höher ungesättigten Fettsäuren keinen Gegensatz zu dem niedrigen Gehalt bei den übrigen niederen Landpflanzen darstellt. Bei den Farnen findet man noch eine C_{20}-Tetraensäure, allerdings nur in geringer Menge.

B. I. Tetraenfettsäure bei Boraginaceen und Labiaten

Nachdem in einer vorangegangenen Arbeit aus Lithospermum off. L.[8] eine Tetraensäure, und zwar die Δ 6,9,12,15-n-octadecatetraensäure isoliert werden konnte, war es naheliegend, auch andere Vertreter dieser Familie näher zu untersuchen. Wir prüften das Samenfett folgender Pflanzen: Symphytum officinale L., Echium vulgare L., Cynoglossum officinale L., Borago officinale L., Heliotropum europaeum L., Anchusa off. L.. Zum Vergleich wurde das Samenöl von Lithospermum herangezogen. Das Samenmaterial bezogen wir aus dem Drogenhandel. Bei 2 Pflanzen, Pulmonaria maculatum und Echium vulgare, prüften wir außerdem, ob und inwieweit sich die FS-Zusammensetzung von der des Samenfettes unterscheidet. Hierzu sammelten wir jeweils die ganze überirdische Pflanze in blühendem Zustand und trennten in Blätter, Blüten und Stengel. Wie eine Chromatographie auf paraffinierten Kieselgurplatten zeigte, war in den Samenfetten aller anderen Boraginaceen die gleiche Fettsäure wie bei Lithospermum enthalten. Auf dem Chromatogramm besitzt diese Säure einen R_f von 0.72 und liegt über der Linolensäure (R_f = 0.63). Auch die Quecksilberaddukt-Chromatographie zeigt, daß im Bereich der Zone IV bei allen untersuchten Pflanzen deutliche Flecken erscheinen (Abb. 19, S. 35). Durch Hydrierung und anschließende Gaschromatographie konnte die Säure eindeutig der C_{18}-Reihe zugeordnet werden. Auch gaschromatographisch läßt sich die C_{18}-Tetraensäure gut von der C_{18}-Triensäure abtrennen. Sie besitzt auf einer EGSSX-Säule eine Retentionszeit von 15.8 und erscheint nach der α-Linolensäure, Retentionszeit 11.6. Da die Säure auch auf einer EGSSX-Säule mit der Testsäure gemischt, einen erhöhten Peak ergibt, ist kaum daran zu zweifeln, daß auch dieser Säure, die für die Lithospermum-Säure aufgestellte Struktur zukommt. Bemerkenswerterweise war diese Säure auch im Kraut von Pulmonaria mac. und Echium vulgare nachzuweisen.

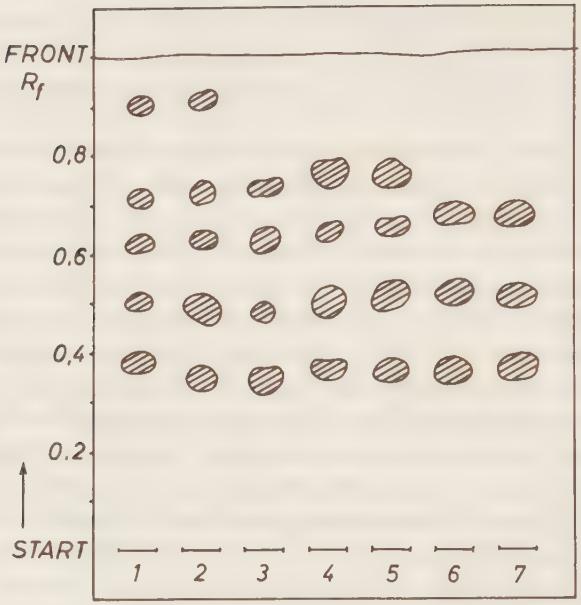


Abb. 18

DC auf paraffiniertem Kieselgel-Laufmittel: Acetonitril-Aceton-Ameisensäure (2:2:1)

1 = Symphytum off. L.
2 = Borago off. L.
3 = Anchusa off. L.
4 = Cynoglossum off. L.
5 = Lithospermum off. L.
6 = Echium vulg. L.
7 = Testlösung C_{18}(1=), C_{18}(2=), C_{18}(3=)

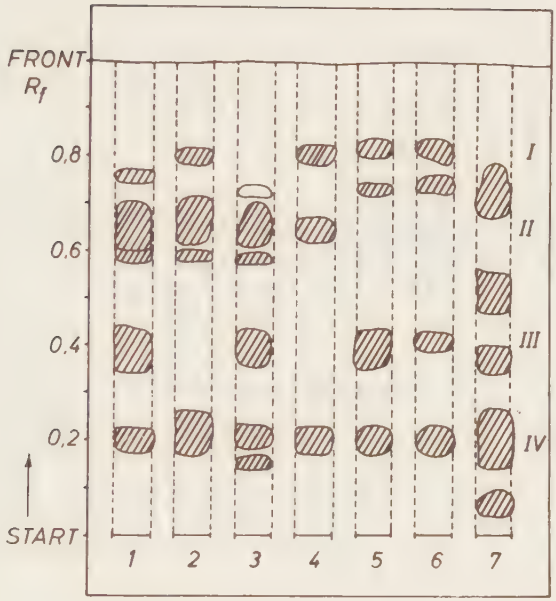


Abb. 19

DC der FS-Quecksilber-Addukte

von

I = Monoene; II = Diene; III = Triene; IV = Tetraene

1 = Testlösung
2 = Echium
3 = Cynoglossum
4 = Anchusa
5 = Heliotropum
6 = Borago
7 = Symphytum

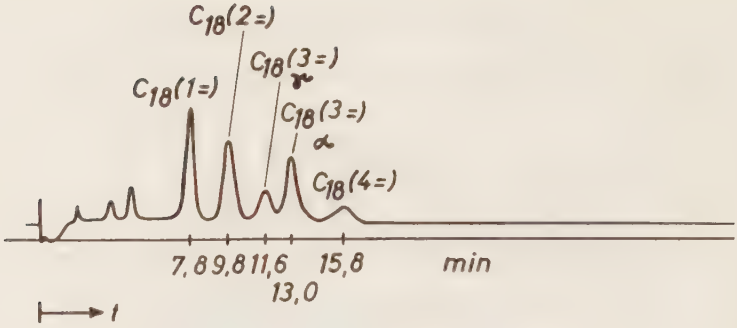


Abb. 20

GC der ungesättigten Fettsäureester auf EGSSX von Lithospermum off. L.

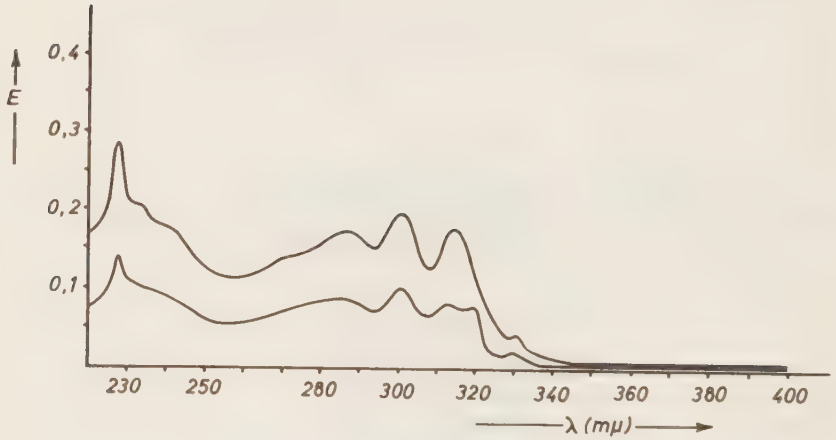


Abb. 21

UV-Alkaliisomerisierungskurve der ungesättigten Fettsäureester und der isolierten Tetraensäureester von Borago

Wie nachfolgende Tab. 9 zeigt, enthielten nicht die Lithospermum-Samen die Hauptmenge an C_{18}-Tetraensäure. Den höchsten Gehalt ermittelten wir bei Echium vulgare. Er betrug 15.57% gegenüber 5.14% bei Lithospermum off. L..

Tabelle 9

FS-Gehalt der Samen einiger Vertreter der Boraginaceen-Familie

	$C_{18}(1=)$	$C_{18}(2=)$	$C_{18}(3=)\gamma$	$C_{18}(3=)\alpha$	$C_{18}(4=)$
Borago off. L.	24.08%	40.13%	29.76%	-	6.02%
Anchusa off. L.	24.64%	30.35%	16.07%	20.0%	8.92%
Cynoglossum off. L.	36.04%	36.43%	9.69%	7.75%	10.07%
Symphytum off. L.	28.61%	40.06%	25.59%	2.02%	3.70%
Echium vulg. L.	15.57%	18.44%	12.7%	37.7%	15.57%
Heliotropum europ.L.	23.27%	76.1%	0.628%	-	-
Lithospermum off. L.	28.79%	25.7%	13.36%	26.9%	5.14%

Nach Abschluß unserer Untersuchungen erschienen Arbeiten von KLEIMAN, EARLE und WOLFF[9] sowie SMITH, HAGEMANN und WOLFF[10], in denen ebenfalls über die Fettsäurezusammensetzung von Boraginaceen-Samen berichtet wird. Bei insgesamt 8 Boraginaceen-Arten fanden die Autoren in Übereinstimmung mit unseren Befunden neben den üblichen C_{18}-Fettsäuren die Δ 6,9,12,15-Octadecatetraensäure. Damit scheint die Säure charakteristisch für diese Familie zu sein. Taxonomisch ist interessant, daß diese Fettsäure der γ-Linolensäure-Familie angehört, also die 4. Doppelbindung wie bei den Polyensäuren des Tierreichs in Richtung zum Carboxylende eingebaut hat.

II. Labiaten

Der Boraginaceenfamilie verwandt sind die Labiaten. Es war daher naheliegend, auch Vertreter dieser Familie auf ihre FS-Zusammensetzung hin zu untersuchen. Zur Untersuchung kamen jeweils die Samenöle von Salvia officinalis L., Hyssopus officinalis L., Thymus vulgare L., Lycopus europaeus L., Marrubium vulgare L., Origanum vulgare L., Galeopsis ochroleuca Lamarck. Wir verglichen auch hier zunächst das Gemisch der Quecksilber-Addukte in der am Anfang beschriebenen Weise. Wie die Abbildungen 22 und 23 erkennen lassen, fehlte in allen Fällen die für die Boraginaceen-Öle charakteristische Zone IV. Die gaschromatographische Prüfung (Abb. 24, S. 40) und Alkaliisomerisierung bestätigt, daß außer $C_{18}(1=)$, $C_{18}(2=)$ und $C_{18}(3=)$FS keine anderen Fettsäuren vorhanden sind. Die Verteilung der einzelnen Fettsäuren in den Gemischen ist aus Tab. 10, S. 40, ersichtlich.

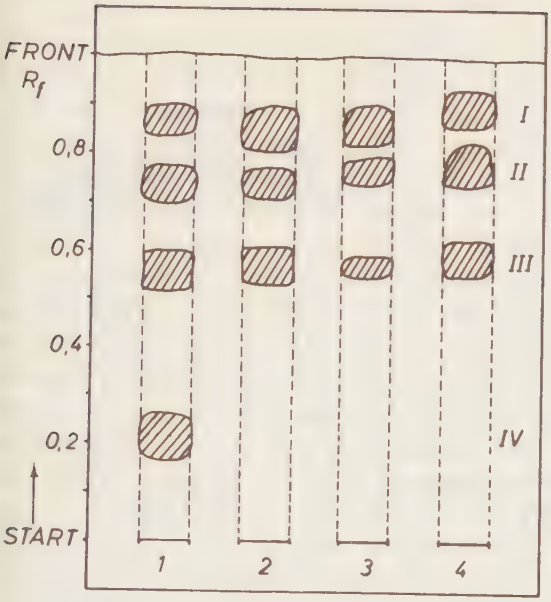


Abb. 22

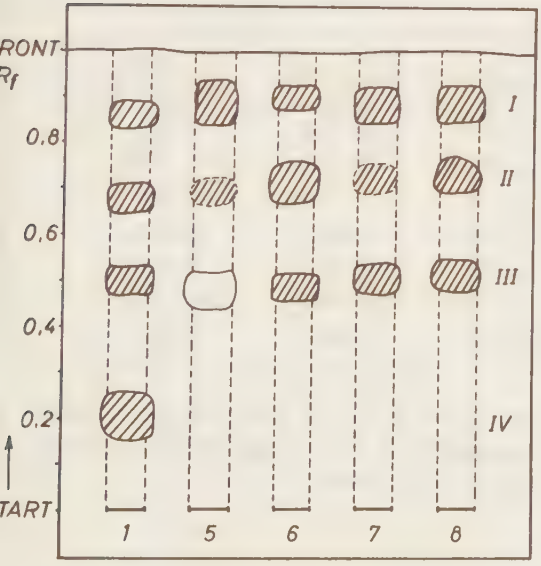


Abb. 23
DC der FS-Quecksilber-Addukte von
1 = Borago off.
2 = Marrubium vulg.
3 = Lycopus europ.
4 = Salvia off.
5 = Galeopsis ochrol.
6 = Thymus vulg.
7 = Origanum vulg.
8 = Hyssopus off.

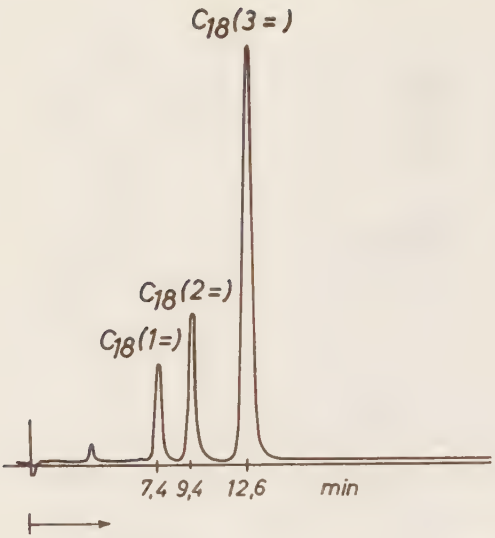


Abb. 24

GC der ungesättigten FS-Ester von Thymus vulg. L.

T a b e l l e 10

FS-Gehalt der Samenöle von sieben Labiaten-Pflanzen

Fettsäuren	$C_{18}(1=)$	$C_{18}(2=)$	$C_{18}(3=)\gamma$
Salvia off.	16.3%	81.14%	2.46%
Hyssopus off.	11.6%	17.3%	71.01%
Thymus vulg.	10.51%	17.84%	71.63%
Lycopus europ.	11.02%	29.1%	59.87%
Marrubium vulg.	23.7%	74.22%	2.07%
Origanum vulg.	5.19%	30.61%	64.19%
Galeopsis ochrol.	15.47%	77.6%	6.94%

Dieser Befund ist ein weiterer Hinweis dafür, daß das ausschließliche Vorkommen der C_{18}-Tetraensäure in der Boraginaceen-Familie als ein chemotaxonomisches Merkmal zu werten ist.

Weshalb einige Vertreter der höheren Systematik neben Linolsäure noch eine Octadecatetraensäure zu bilden vermögen, ist unbekannt. Als Erklärung wäre denkbar, daß es im Zuge der evolutionären Entwicklung bei einigen Vertretern außerhalb der Entwicklungslinie zu einer nachträglichen Neuerwerbung, d.h. zur eigenen Anlage von weiteren Doppelbindungen gekommen ist. Viel wahrscheinlicher aber dürfte es bei den anderen höheren Pflanzen, die keine Tetraensäure mehr bilden, zum Verlust einer früher einmal bestandenen Fähigkeit zur Dehydrierung gekommen sein. Das würde bedeuten, daß namentlich solche Pflanzen, die in der phylogenetischen Entwicklung tiefer stehen oder unmittelbar an den Stamm der Algen anschließen, noch Überreste dieser einstmals bestandenen Syntheseleistung besitzen. KAUFMANN[6] vertrat 1948 die Meinung, daß Samen, die einen hohen Wasserbedarf haben, größere Mengen ungesättigter Fettsäuren bilden. Diese Hypothese wird durch unsere Versuchsergebnisse weitgehend bestätigt. Wie die Tab. 6, S. 29, zeigt, handelt es sich bei Typha minima, Scirpus lacustris und Potamogeton um Wasserpflanzen oder Pflanzen, die feuchte Standorte bevorzugen. Die einzige Ausnahme sind die Boraginaceen, Tecoma stans und die in Tab. 11, S.42, aufgeführten Impatiens-Arten.

Über das Vorkommen von Tetraenfettsäuren im Pflanzenreich

Nachdem das Vorkommen von Tetraensäure in der Pflanzenwelt lange Zeit als Ausnahme galt, soll in folgendem Kapitel eine Übersicht über das Auftreten dieser Säure gegeben werden. Lange Zeit waren höher ungesättigte Fettsäuren mit mehr als drei Doppelbindungen nur in der Tierwelt bekannt. Erst in den letzten Jahren sind Tetraensäuren neben Pentaen- und Hexaensäuren als Bestandteile der Algen-Lipoide in größeren Mengen gefunden worden. Bei diesen Tetraensäuren handelte es sich in der Hauptsache um C_{16}- und C_{20}-Fettsäuren. Eine C_{18}-Tetraensäure, und zwar die Δ 4,8,12,15-Octadecatetraensäure wurde erstmals in Parinarium laurinum aufgefunden. Dieses Vorkommen wird nun ergänzt durch die Δ 6,9,12,15-Octadecatetraensäure, die charakteristisch für die Boraginaceen-Familie zu sein scheint und in Moosen und Bärlappgewächsen auftritt. In der nachfolgenden Tabelle sind alle Pflanzen-Familien oder -Arten zusammengestellt, in denen bisher Tetraenfettsäuren nachgewiesen wurden.

T a b e l l e 11

Vorkommen an Tetraensäure in der Pflanzenwelt

	$C_{16}(4=)$	$C_{18}(4=)$	$C_{20}(4=)$	Literatur
Algen				
Rotalgen (Rhodophyta)		+	+	
Braunalgen (Phaeophyta)		+	+	
Grünalgen (Chlorophyta)	+	+	+	POHL[2)]
Flechten				
Parmelia physodes		+		
Usnea barbata		+		
Lichen islandicus		+		
Moose (Bryophyta)				
Lebermoose (Hepaticae)				
Fegatella			+	

Fortsetzung S. 43

Fortsetzung Tabelle 11

	$C_{16}(4=)$	$C_{18}(4=)$	$C_{20}(4=)$	Literatur
Laubmoose (Musci)				
Polytrichum juniper.			+	
Polytrichum commune			+	
Hedwigia cil.			+	
Rhytidiadelphus triq.			+	
Hylocomium splend.		+	+	
Mnium cusp.				SCHLENK, 7) GELLERMANN
Farnpflanzen (Pterophyta)				
Bärlappgewächse (Lycopodiinae)				
Adiantum ped.		+	+	
Lycopodium clav.			+	
Onoclea sens.			+	
Schachtelhalmgewächse (Equisetinae)				
Equisetum arv.			+	
Equisetum hyemale			+	

	$C_{16}(4=)$	$C_{18}(4=)$ Δ 6,9,12,15	$C_{20}(4=)$ Δ 5,8,11,14	Literatur
Farne (Filicinae)				
Pteridium aquilinum			+	
Dryopteris filix mas			+	
Osmunda claytoniana			+	
Matteucia strutiopteris			+	SCHLENK, 7) GELLERMANN
Nacktsamige Pflanzen (Gymnospermae)				
Cycadeen (Cycadinae)				
Cycas revoluta		+		
Ginkgoinae			Δ 5,11,14,17	
Ginkgo biloba			+	
Typha minima		+		
Scirpus lacustris		+		SCHLENK 7) GELLERMANN
Potamogeton		+		
Boraginaceen (Boraginaceae)		+		vgl. KLEIMAN, 9) EARLE, WOLFF s. diese Arbeit

Fortsetzung S. 44

Fortsetzung Tabelle 11

Sonderfälle des Vorkommens von Tetraenfettsäuren				
	$C_{16}(4=)$	$C_{18}(4=)$	$C_{20}(4=)$	Literatur
			Δ 5,8,11,14	
		3-trans-, 9,12,15		
Tecoma stans L. (syn.Stenolobium stans)		+ nicht konj.		ARPINO[11]
		Δ 9,11,13,15		
Impatiens Roylei		+		
Impatiens Parvifl.		+		KAUFMANN[6]
Impatiens noli tangere		+		
Hibiscus mutabilis			+	YUGAKAKU[12]
Simaruba glauca			+	ARPINO[11]

Fraktionierung und Auftrennung von Fettsäuregemischen durch präparative Gaschromatographie

Trotz einer Reihe bekannter Trennverfahren ist die Auftrennung von Polyenfettsäuregemischen im präparativen Maßstab noch wenig befriedigend gelöst. Die meisten Methoden, die bisher angewendet wurden, erlaubten nur Gruppentrennungen oder die Isolierung von Fettsäuren mittlerer Kettenlänge und mit nicht mehr als drei Doppelbindungen. Die einfachste Art der präparativen Trennung stellt die Kristallisation aus organischen Lösungsmitteln bei tiefen Temperaturen dar. Eine Übersicht mit Arbeiten dieser Methode gibt SCHLENK[13]. Nachteilig bei diesem Verfahren ist, daß man keine völlig reinen Fraktionen erhält. Sehr häufig wurde vor allem von der Schule KLENK[14-20] die Hochvakuumdestillation zur Fettsäureanalyse von Organ- und Fischlipoiden herangezogen. Abgesehen davon, daß hierfür relativ komplizierte Kolonnen nötig sind und Mengen von etwa 30 g Ester eingesetzt werden, gelang es nach diesem Verfahren beispielsweise nicht, Estergemische in Mengen zwischen 10 und 50 mg aufzutrennen.

Nachdem die Gegenstromapparaturen soweit vervollkommnet wurden, daß eine Automatisierung möglich war, gelang es durch Anwendung des Kreisprozesses in 400 bis 500 Verteilungsschritten ungesättigte Fettsäuren aufzutrennen. So trennten AHRENS und CRAIG[21] 1952 erstmals gesättigte Fettsäuren (C_{12} - C_{18}), sowie ungesättigte Fettsäuren ($C_{18}(1=)$, $C_{18}(2=)$ und $C_{18}(3=)$). Neben dem hohen Zeit- und Materialaufwand war von Nachteil, daß die zu trennenden Fettsäuremischungen vorfraktioniert werden mußten und nur relativ geringe Mengen an reiner Substanz erhalten wurden.

Bessere Resultate in kurzer Zeit brachte die Säulenchromatographie. Z.B. gelang es HOWARD und MARTIN[22] erstmalig, gesättigte Fettsäuren auf silaniertem und paraffin-imprägnierten Kieselgel nach dem Prinzip der Umkehrphasenchromatographie zu trennen.

HOFMANN[23] befaßte sich mit der Trennung von Quecksilber-II-Acetat-Addukten auf nicht imprägnierten Kieselgelsäulen, erhielt aber alle höher als dreifach ungesättigten Fettsäuren zusammen in einer Fraktion.

Nach Einführung der Dünnschichtchromatographie wurde auch diese Methode auf ihre Brauchbarkeit zur Fettsäuretrennung geprüft. Sie erwies sich grundsätzlich als brauchbar, gestattete aber nur die Auftrennung geringer (etwa 6 - 7 mg) Substanzmengen. Eine Verbesserung brachte die Auftrennung der FS über ihre Quecksilber-Addukte. Die Methode gestattete es, genügende Substanzmengen (10 - 15 mg) für eine exakte Strukturaufklärung abzutrennen. Um diese Menge zu erhalten, mußten mindestens 8 - 10 Platten verwendet werden.

Wie die systematische Erprobung der aufgeführten Methoden in unseren Laboratorien zeigte, bildete vor allem die präparative Auftrennung von Polyenfettsäuren ein noch ungelöstes Problem.

Nachdem heute die Gaschromatographie bei der qualitativen Auftrennung von Fettsäuren zur Methode der Wahl geworden ist und neuerdings auch Apparaturen zur präparativen Auftrennung entwickelt wurden, war es naheliegend, diese Verfahren auf ihre Brauchbarkeit zur Trennung oder Reinigung von Polyenfettsäuren zu prüfen. Die Fragestellung lautete vor allem:

1. Ist es möglich, Polyenfettsäuren bei den hohen Trenntemperaturen in vernünftigen Ausbeuten wiederzugewinnen ?
2. Wie groß ist die Selektivität, bei Fettsäuren mit ähnlicher chemischer Struktur ?
3. Mit welchen Veränderungen muß bei der präparativen Gaschromatographie gerechnet werden?

. I. Reinigung einer Linolensäure des Handels durch präparative Gaschromatographie

Als einfaches Modellbeispiel wählten wir zunächst eine Mischung von Δ 9,12,15-C_{18}-Triensäure mit wenig C_{16}-Tetraensäure. Wir verwendeten hierzu die Linolensäure des Handels (Fa.C.Roth, Karlsruhe). Laut Gaschromatogramm enthielt diese Säure noch 13.25% dieser Tetraensäure. Nachdem die Substanz mit Diazomethan methyliert war, lieferte sie dünnschichtchromatographisch das nachstehende Bild (Abb. 25).

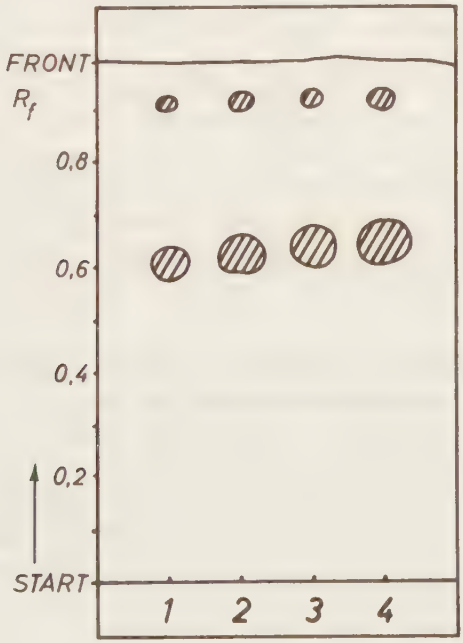


Abb. 25

DC eines Linolensäureesters des Handels

Die Unterschiede in den Retentionszeiten (Abb. 26) waren so groß (γ-Linolensäure 19.4; C_{16}-Tetraensäure 7.2), daß eine Abtrennung durch präparative Gaschromatographie erwartet werden konnte.

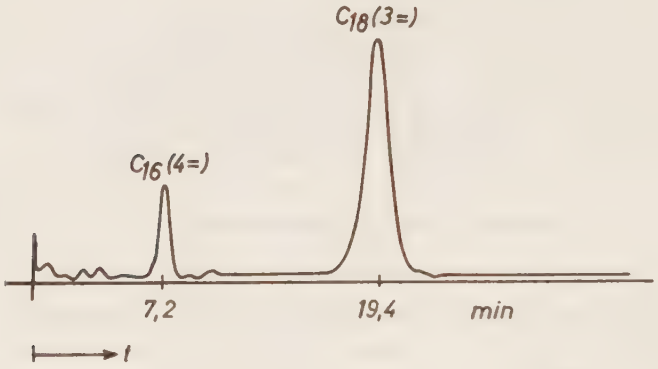


Abb. 26

GC eines Linolensäuresters des Handels

Die Trennungen wurden auf einer EGSSX-Säule (15%ig auf Gaschrom P) bei einer Säulentemperatur von 165°C durchgeführt. Ausgehend von 1.854 g Fettsäuregemisch erhielten wir durch Herausfraktionierung des Hauptpeaks und vorsichtiges Trocknen der Substanz über KOH und Paraffinspänen im Vakuumexsikkator 0.5743 g. Da nach der gaschromatographischen Analyse 13.6% Tetraensäure vorhanden waren, wurden von 1.60 g tatsächlich vorhandener Linolensäure nur noch 35.8% wiedergefunden.

Nachfolgende Tabelle gibt nochmals eine genaue Übersicht über eingesetzte Mengen und Ausbeuten (Tab. 12, S. 49).

Tabelle 12

	Einwaage
Eingesetzte Substanzmenge:	
$C_{18}(3=)$ und $C_{16}(4=)$	1.854 g
berechnete, tatsächliche Menge an Linolensäure	1.60 g = 86.4%
Verunreinigung $C_{16}(4=)$ FS	0.2507 g = 13.6%
Auswaage:	0.5743 g = 35.8%

Um zu prüfen, ob bei der Fraktionierung kein Abbau oder anderweitige Veränderungen eingetreten waren, wurde die gereinigte Linolensäure erneut in den Gaschromatographen eingespritzt. Durch Überspritzen mit einer Testsäure ließ sich einwandfrei feststellen, daß die Säure rein war und keine Isomerisierung eingetreten war. Der Verlust dürfte zum größten Teil auf die hohe Temperatur bei der Trennung zurückzuführen sein.

II.a. Präparative Trennung von Δ 5,8,11,14-eicosatetraen- und Δ 5,8,11,14,17-eicosapentaensäure

Nachdem, wie das vorangegangene Beispiel gezeigt hat, eine präparative gaschromatographische Trennung von $C_{18}(2=)$ und $C_{18}(3=)$-Fettsäuren Erfolg hatte, versuchten wir die Trennung einer C_{20}-Tetraen- von einer C_{20}-Pentaensäure. Dieses Beispiel wurde gewählt, da diese beiden FS recht häufig nebeneinander in tierischen Ölen oder auch in Algenlipoiden anzutreffen sind. Auch hier sind die Unterschiede in den Retentionszeiten im Gaschromatogramm relativ günstig. Die Retentionszeit für die $C_{20}(4=)$ betrug auf EGSSX-Säulen 40.0, für die $C_{20}(5=)$ 50.4 (siehe Abb.27).
Zur Bereitung der Modellmischung wählten wir die ungesättigten Fettsäuren aus Nebennieren, die in relativ hoher Konzentration die C_{20}-Tetraensäure enthalten (s.Abb.28). Als C_{20}-Pentaensäurequelle schien Fischöl geeignet.

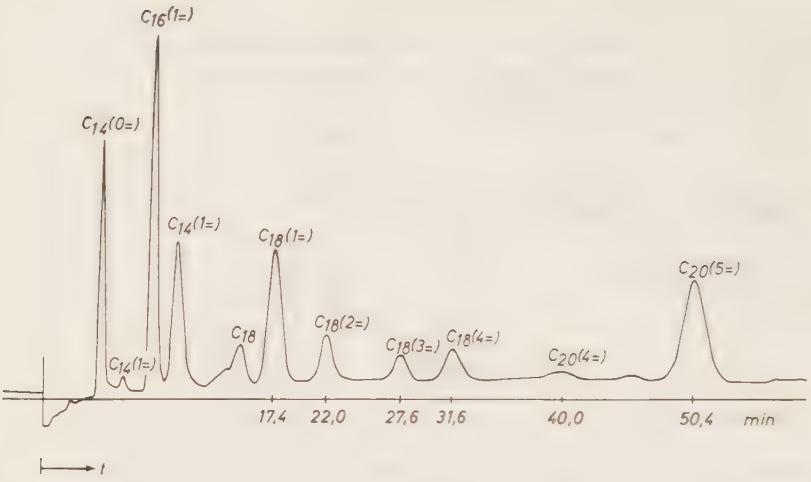


Abb. 27

GC der ungesättigten Fettsäure-Ester des Fischöls
Säule: EGSSX

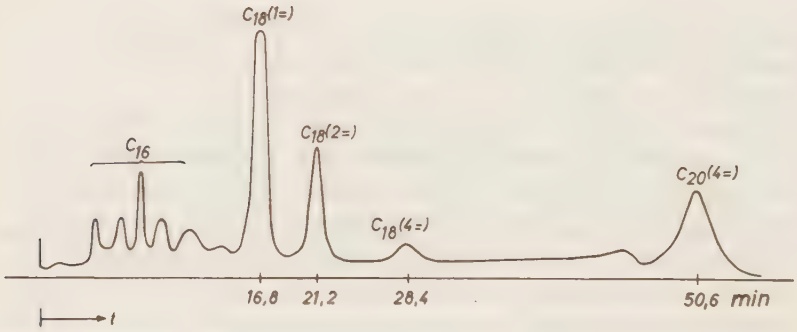


Abb. 28

GC der ungesättigten Fettsäure-Ester aus Nebennieren
Säule: EGSSX

Zur Extraktion des gefriergetrockneten Nebennierenmaterials verwendeten wir Methanol-Chloroform (2:1). Wir verseiften den Rohextrakt nach einer Methode von ZÖLLNER-EBERHAGEN[24] mit n-NaOH. Nach dem Ausfrieren der gesättigten FS als Na-Salze wurden die ungesättigten FS durch Ansäuern mit Salzsäure und Ausschütteln mit Petroläther gewonnen. Das mit Diazomethan hergestellte Estergemisch chromatographierten wir auf paraffinierten Platten und die Quecksilber-Acetat-Addukte auf Kieselgel-Kieselgur-Platten. Auf Grund des von WAGNER und POHL[25] ausgearbeiteten Schemas war eine Tetraensäure in dem Gemisch enthalten (Abb. 29).

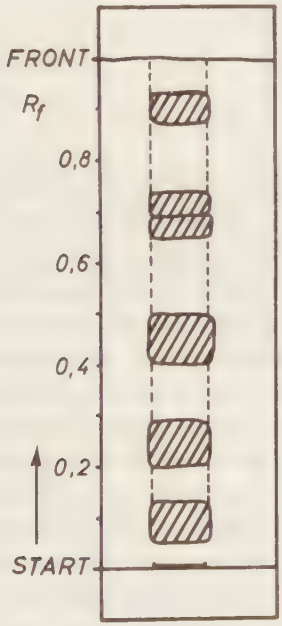


Abb. 29

DC der Quecksilber-Addukte der ungesättigten FS-Ester aus Nebennieren

Gaschromatographisch wurde folgende Zusammensetzung ermittelt: C_{16}-Säuren, C_{18}(1=)FS, C_{18}(2=)FS und etwa 30% C_{20}-Tetraensäure. Wir mischten die Probe mit käuflichen Arachidonsäure-Ester, wobei deutlich eine Peakerhöhung eintrat. Die prozentuale Verteilung der einzelnen Säuren war folgende:

Tabelle 13

C_{16}-Säuren	1.2%
C_{16}-Säuren	2.35%
C_{16}-Säuren	5.4%
C_{16}-Säuren	3.02%
C_{16}-Säuren	3.48%
$C_{18}(1=)$	39.5%
$C_{18}(2=)$	12.7%
$C_{18}(4=)$	2.6%
$C_{20}(4=)$	29.5%

Für die gaschromatographische Trennung setzten wir eine Menge von 1.6296 g Fettsäureester ein. Hierbei handelte es sich um die Mischung der FS-Ester des Fischöls und der ungesättigten Fettsäureester des Nebennierenextraktes zu gleichen Teilen. Beide Gemische enthielten zusammen 11.8% Tetraen- und 7.87% Pentaensäure. Eine Vorreinigung hielten wir nicht für nötig, da die einzelnen Peaks soweit auseinander lagen, daß sie ohne Schwierigkeiten getrennt werden konnten. Die Trennung erfolgte auf EGSSX (15%ig auf Gaschrom P) bei 175°C Säulentemperatur. Nach Fraktionieren der Hauptpeaks wurden die Substanzen, wie bereits beschrieben, getrocknet und gewogen. Die folgende Tabelle gibt eine genaue Übersicht über die eingesetzten Mengen und Ausbeuten an Tetraen- und Pentaensäure.

Tabelle 14

Fettsäuregemisch aus Nebenniere und Fischöl	
Einwaage:	1.6296 g
Gehalt an $C_{20}(4=)$ in der Einwaage:	11.8%
Gehalt an $C_{20}(5=)$ in der Einwaage:	7.87%
Ausbeute:	
$C_{20}(4=)$	27.7 mg = 14.4% der eingesetzten Menge
$C_{20}(5=)$	49.1 mg = 38.2% der eingesetzten Menge

Wie die Werte obiger Tabelle zeigen, läßt sich die Pentaensäure durch präparative Gaschromatographie von einer Tetraensäure trennen. Allerdings waren die Verluste sehr groß.

b. Präparative gaschromatographische Trennung eines natürlichen Gemisches einer Δ 5,8,11,14-Eicosatetraen- und einer Δ 5,8,11,14,17-Eicosapentaensäure

Bei der im vorherigen Kapitel beschriebenen Trennung wurde ein Gemisch zweier natürlich vorkommender FS-Mischungen verwendet, von denen die eine eine C_{20}-Tetraen- die andere eine C_{20}-Pentaensäure enthielt. Aus diesem Grunde wurde diese Trennung an einem natürlich vorkommenden Fettsäuregemisch, das bereits beide Säuren enthielt, wiederholt. Da, wie KLENK und MONTAG[26] beschrieben haben, Leberphosphatide überwiegend Arachidonsäure und C_{20}-Pentaensäure (Δ 5,8,11,14,17-Eicosapentaensäure) enthalten, wählten wir frische Rinderleber, um daraus die gesamten ungesättigten Fettsäuren zu isolieren.

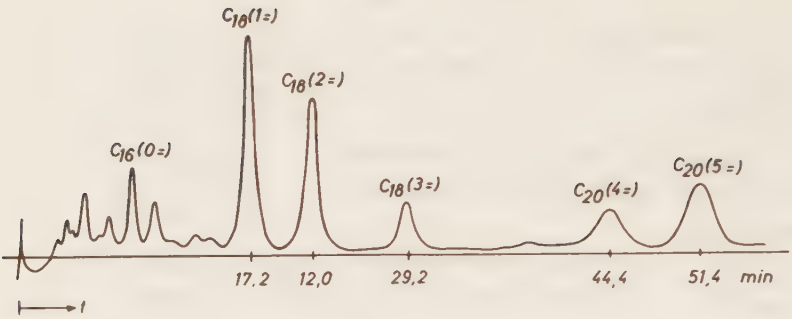


Abb. 30

GC der gesamten ungesättigten FS-Ester aus Rinderleber

Das methylierte Gemisch der gesamten ungesättigten Fettsäuren wurde gaschromatographisch auf den Gehalt an $C_{20}(4=)$ und $C_{20}(5=)$-Fettsäure geprüft. Die beiden Säuren waren zu 7.35% ($C_{20}(4=)$) und 14.43% ($C_{20}(5=)$) enthalten. Durch Zugabe von Testarachidonsäure zum Gemisch trat eine Peakerhöhung der C_{20}-Tetraensäure ein. Die C_{20}-Pentaensäure wurde durch Vergleich der Retentionszeiten auf dem Testchromatogramm ermittelt.

Eingesetzte Menge des Fettsäuregemisches: 0.38 g.

T a b e l l e 15

Polyenfettsäuren	Einwaage mg	Auswaage mg	Ausbeute in % berechnet auf die eingesetzte Säuremenge
$C_{20}(4=)$	27.93	9.8	35.09
$C_{20}(5=)$	54.85	12.3	22.04

Die auf einer EGSSX-Säule erhaltenen Ausbeuten stimmen nicht mit denen der vorherigen Trennung überein. Das Mengenverhältnis der Tetraen- zur Pentaensäure ist umgekehrt, d.h. die Ausbeute an $C_{20}(4=)$-Säure ist höher. Dieses läßt sich mit dem ebenfalls vertauschten Mischungsverhältnis der eingesetzten Säuren erklären. Unseren Erfahrungen nach ist die Höhe der Ausbeuten bei der Trennung einer C_{20}-Tetraensäure von einer C_{20}-Pentaensäure nicht proportional der eingesetzten Menge. Sie ist vermutlich von der Absorptionskraft der Säule abhängig. Zur Identitätsprüfung der getrennten Fettsäuren wurden die erhaltenen Fettsäuren der Alkaliisomerisierung unterworfen (Abb. 31).

Außerdem verglichen wir die IR-Spektren der Fettsäuren vor und nach ihrer Auftrennung. Die Substanzen hatten keine Isomerisierung erfahren. Wie die GC der aufgetrennten Tetraensäure und Pentaensäure zeigen (Abb. 32 u. 33), enthielten diese nur eine kleine Verunreinigung (ca. 9%).

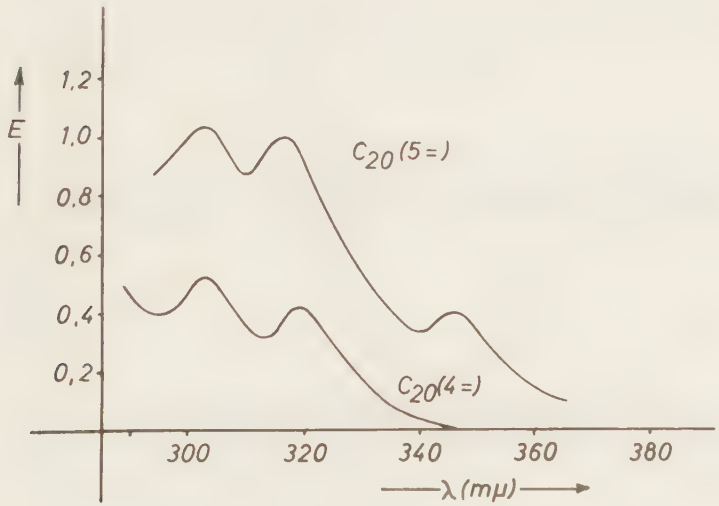


Abb. 31

UV-Alkaliisomerisierungskurven der $C_{20}(4=)$, $C_{20}(5=)$-Fettsäuren nach gaschromatograph. Auftrennung

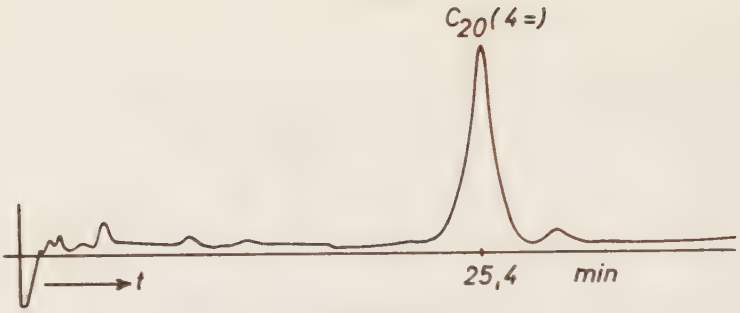


Abb. 32

GC des aufgetrennten Tetraenfettsäureesters

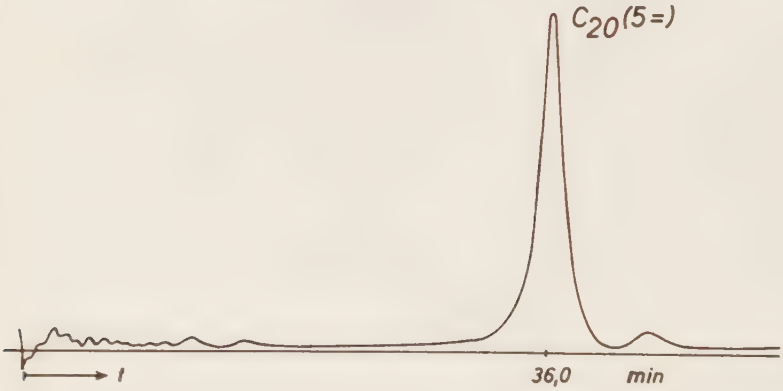


Abb. 33

GC des aufgetrennten Pentaenfettsäureesters

III. Präparative gaschromatographische Trennungen von Linol- und Linolensäure in unterschiedlichem Mischungsverhältnis bei konstanter Säulentemperatur

Da die Δ 6,9-Octadecadien-(Linolsäure) und die Δ 9,12,15-Octadecatriensäure (γ-Linolensäure) in vielen tierischen und pflanzlichen Ölen miteinander vergesellschaftet vorkommen, bereitete die Reindarstellung der Linolsäure schon von jeher gewisse Schwierigkeiten. Ob zur Lösung dieses Problems auch die präparative Gaschromatographie beitragen kann, sollten die folgenden Versuche zeigen. Unsere erste Trennung führten wir mit 0.74 g einer Mischung von gleichen Teilen reiner Linol- und Linolensäureester des Handels durch.

Die Estermenge wurde in 4 ml Chloroform pro analysi gelöst und jeweils in Portionen von 100 µl aufgetrennt. Die Säulentemperatur betrug 165°C. Während der Trennung wurden nur die Hauptpeaks aufgefangen. Die erhaltenen Ester wurden gewogen und daraus die prozentuale Ausbeute bzw. der Verlust an Substanz berechnet (siehe folgende Tabelle).

Tabelle 16

	Einwaage mg	Auswaage mg	Ausbeute %
Mischung	742.5	172.2	-
Linolensäureester	371.25	63.0	16.97
Linolsäureester	371.25	109.2	29.41

Demnach betrug der Verlust an C_{18}(3=)-FS 83.03% und an C_{18}(2=)-FS 70.59%. Wie die gaschromatographische Überprüfung auf einer EGSSX-Säule ergab, enthielten beide FS aber noch geringe Mengen der anderen Säure.

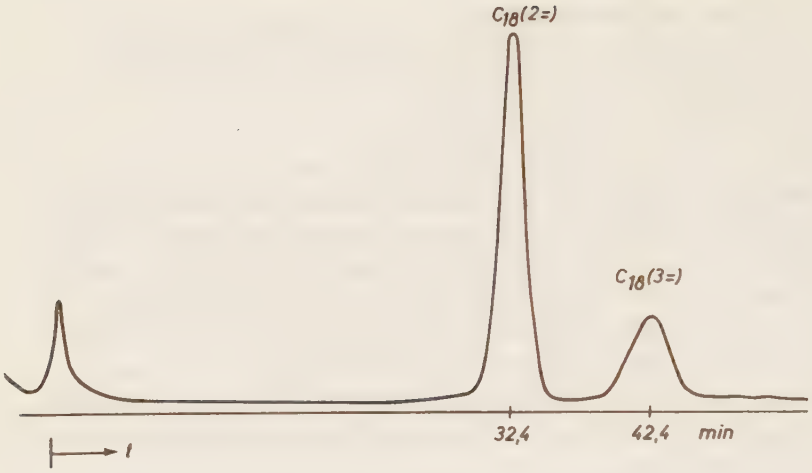


Abb. 34

GC der Linolsäure nach der präparativen Trennung
Säule: EGSSX

Die $C_{18}(3=)$ war mit 16.2%, $C_{18}(2=)$ und die $C_{18}(2=)$ mit 3.93% $C_{18}(3=)$ verunreinigt.

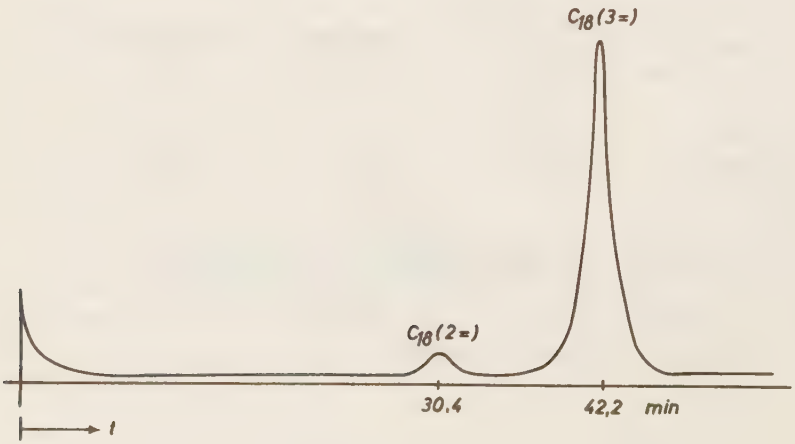


Abb. 35

GC der Linolensäure nach der präparativen Trennung
Säule: EGSSX

Eine exakte Auftrennung der beiden FS bei dem Komponentenverhältnis 1:1 war demnach nicht gelungen.

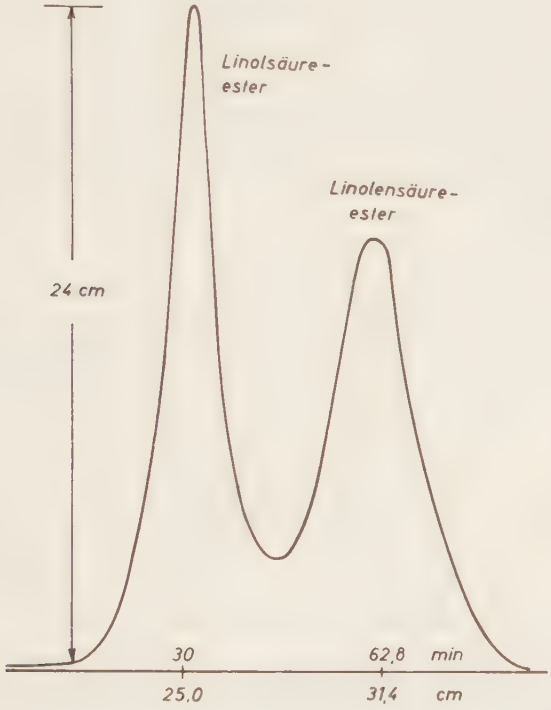


Abb. 36

GC eines Gemisches von $C_{18}(2=)$ und $C_{18}(3=)$
Säule: EGSSX

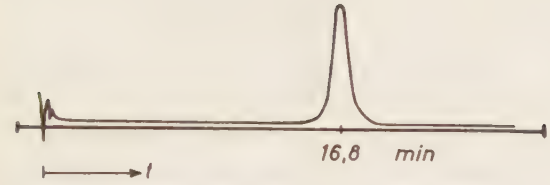
Bei der im folgenden beschriebenen Trennung verwendeten wir eine Modellmischung von Linolsäure- und Linolensäure-Ester im Mischungsverhältnis 8:2. Wir wählten dieses Mengenverhältnis, um zu prüfen, ob die Trennung reinere Substanzen liefert, wenn eine der beiden Komponenten in wesentlich geringerer Menge in der Mischung enthalten ist. Bei dieser Trennung er-

wies sich von drei Säulenmaterialien EGSSX auf Gaschrom P, 15% silikonisiert als beste Phase. Die einzelnen Peaks fielen steil ab, so daß eine scharfe Trennung erreicht werden konnte. Bei einer Kieselgelsäule, die mit 20% LAC imprägniert war oder einer Reoplex-Säule (20% auf Chromosorb) waren die Peaks wesentlich flacher und die Linolensäure jeweils stark mit Linolsäure verunreinigt. Die Säulentemperatur betrug 165°C. Die Tab. 17 gibt eine Übersicht über die eingesetzten und erhaltenen Mengen.

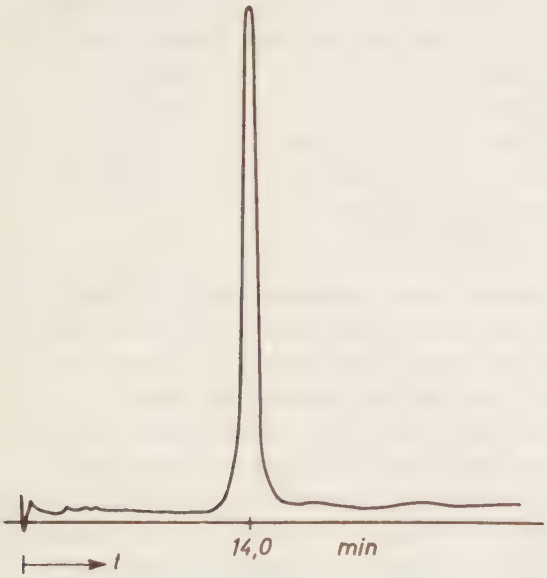
Tabelle 17

Gesamte aufgetrennte Menge	Einwaage mg	Auswaage mg	Ausbeute in % auf eingesetzte Menge bezogen
151.5 mg 649.6 mg			
Linolsäure	a) 121.2	23.0	18.9
	b) 519.68	69.0	13.3
Linolensäure	a) 30.3	8.8	29.04
	b) 129.92	33.9	26.0

Die Identitäts- und Reinheitsprüfung der aufgetrennten Substanzen erfolgte gaschromatographisch (Abb. 37, S. 61). Beim Überspritzen der aufgefangenen Methylester mit den unvorbehandelten Substanzen traten Peakerhöhungen ein. Die Trennung verlief somit sehr erfolgreich. Sie lieferte völlig reine Substanzen. Verglichen mit der zuvor beschriebenen Modellmischung wird offenbar eine höhere Trennschärfe erreicht, wenn eine der beiden Mischungskomponenten in einer geringeren Menge vorliegt.



GC von Linolensäure-methylester nach Auftrennung auf EGSSX-Säule (15%) R.Z. 16.8



GC von Linolsäure-methylester nach Auftrennung auf EGSSX-Säule (15%) R.Z. 14.0

Abb. 37

Präparative gaschromatographische Trennung Linolsäure (80%) - Linolensäure (20%) bei verschiedenen Säulentemperaturen

Wie die Erfahrung zeigt, dürften die relativ hohen Verluste durch die angewandten hohen Temperaturen bedingt sein. Wir prüften daher an der Modellmischung (8:2), ob und in welchem Maße bei gleichem Säulenmaterial die Ausbeute von der Säulentemperatur abhängig ist. Nachdem die Säulentemperatur für die bisherigen Trennungen 165°C betrug, wurden nun Temperaturen von 155°C und 175°C gewählt. Nach Auswaage der aufgefangenen und über Nacht im Vakuumexsikkator über KOH und Paraffinspänen getrockneten Ester zeigte sich, daß bei steigender Temperatur eine höhere Ausbeute erhalten wurde. (Das gleiche Resultat brachte die Versuchsreihe mit einer radioaktiven Linolsäure, die in einem späteren Kapitel beschrieben ist).

Die aufgefangenen Ester wurden einer gaschromatographischen Prüfung unterworfen. Hierbei lieferte die Linolsäure einwandfreie, saubere Peaks, die mit einem Test identisch waren. Die Linolensäure, die bei 155°C abgetrennt worden war, enthielt noch 14.8% Linolsäure. Bei 175°C wurde die gesamte Linolensäure zerstört. Auf dem Chromatogramm trat ein einzelner Peak auf, dessen Retentionszeit von 4.8 unter der einer $C_{16}(0)$-Säure von 7.0 lag. Vermutlich stellt der erhaltene Peak ein Oxydationsprodukt dar (Abb. 38, S. 63). Bei der Linolsäure steigt die Ausbeute mit der Temperatur, bei der Linolensäure nimmt jedoch mit steigender Temperatur die Zersetzung zu, da diese Säure infolge der größeren Anzahl an Doppelbindungen leichter oxydiert wird.

Die einzelnen Werte sind in nachfolgenden Tabellen 18 und 19 enthalten.

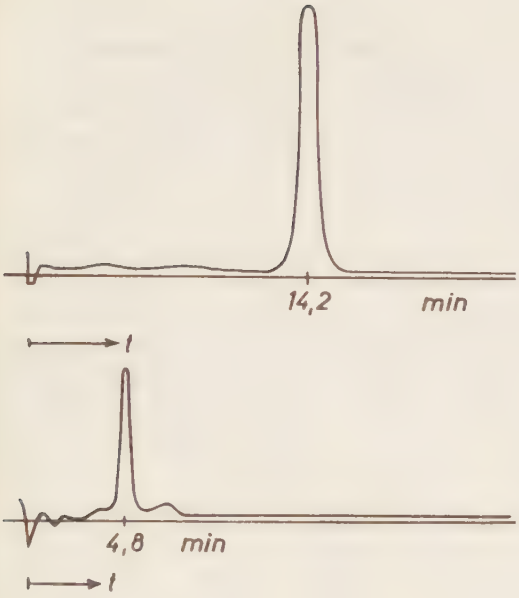


Abb. 38

GC des Linolsäureesters und Linolensäureesters (zerstört) nach der Auftrennung

T a b e l l e 18

Säulen-temperatur		Einwaage mg	Auswaage mg	Ausbeute %
155°	Linolsäure	124.24	25.1	20.2
	Linolensäure	31.06	2.5	8.05
175°	Linolsäure	246.4	99.2	40.26
	Linolensäure	48.6	10.0	20.57

T a b e l l e 19

Vergleich der Ausbeuten bei drei verschiedenen Temperaturen

Säulentemperatur			Einwaage mg	Auswaage mg	Ausbeute %
155°	Linolsäure		124.24	25.1	20.2
	Linolensäure		31.06	2.5	8.05
165°	Linolsäure	a)	121.2	23.0	18.9
		b)	519.68	69.0	13.3
	Linolensäure	a)	30.3	8.8	29.04
		b)	129.92	33.9	26.0
175°	Linolsäure		246.4	99.2	40.26
	Linolensäure		48.6		
	Die erhaltene Substanz war völlig zerstört.				

IV. Präparative GC-Trennung eines natürlichen Gemisches von $C_{18}(2=)$ und $C_{18}(3=)$-Fettsäuren

Die Fettsäuregemische, die man aus tierischen oder pflanzlichen Neutralfetten oder Phosphatiden isoliert, enthalten, soweit überhaupt ungesättigte Fettsäuren der C_{18}-Reihe vorliegen, nur selten die C_{18}-Dien- und C_{18}-Triensäure in gleicher Konzentration. In den meisten Fällen überwiegt einer der beiden Komponenten. Es sollte also auch bei natürlichen Fettsäuregemischen möglich sein, eine der beiden Säuren durch präparative Gaschromatographie herauszufraktionieren. Zur Demonstration wählten wir ein Fettsäuregemisch aus den Samenlipoiden von Thymus vulgaris. Es enthielt ungefähr 17.9% $C_{18}(2=)$ und 10.1% $C_{18}(3=)$.

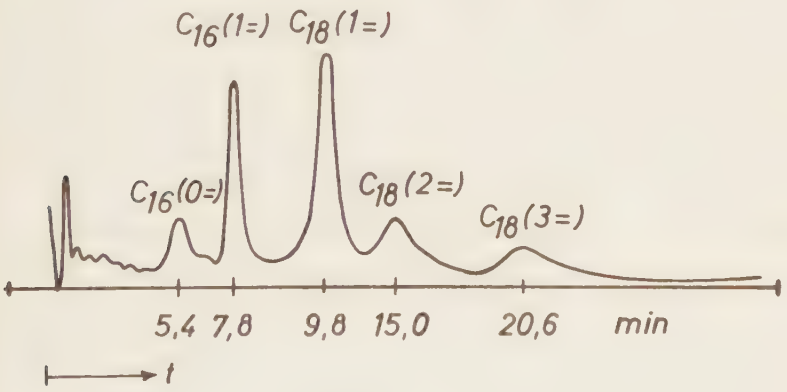


Abb. 39

GC der gesamten ungesättigten Fettsäureester aus Thymus vulg.
Säule: EGSSX

Als Säulenmaterial verwendeten wir wiederum Kieselgel mit EGSSX imprägniert. Die Säulentemperatur betrug 165°C. Die Prüfung der aufgetrennten Ester erfolgte, wie bereits bei der letzten Trennung beschrieben.

Folgende Mengen wurden eingesetzt:

T a b e l l e 20

Gesamte aufgetrennte Menge an FS-Estern: 244 mg	
Gehalt an Linolsäure in der Einwaage	42.456 mg
an Linolensäure in der Einwaage	21.5695 mg

Die Auswaagen betrugen:

für Linolsäure 4.6 mg = 10.8% (bezogen auf die eingesetzte Estermenge)

für Linolensäure 0.9 mg = 4.17%

Das Ergebnis deckt sich in den Ausbeuten nicht mit dem im vorangegangenen Kapitel beschriebenen. Die erhaltenen FS-sauremengen lagen unter denen der bisherigen Versuchsreihen.

V. Überprüfung des Substanzverlustes bei der q u a l i t a t i v e n Gaschromatographie

Bei den hohen Temperaturen, die zur gaschromatographischen Auftrennung von Polyenfettsäuren erforderlich sind, geht erfahrungsgemäß ein gewisser Prozentsatz an FS durch Polymerisation verloren. Da der Verlustanteil mit Sicherheit von der Zahl, aber vermutlich auch von der Lage der Doppelbindungen abhängt und damit nicht für alle Fettsäuren gleich ist, hat es sich als zweckmäßig erwiesen, die Peakfläche der einzelnen Fettsäuren nicht auf die eingespritzte Fettsäuremenge, sondern auf die Gesamtpeakfläche zu beziehen.

Um in Erfahrung zu bringen, wie hoch nun im Einzelnen der Verlustanteil beträgt, haben wir mehrere Versuche mit einer radioaktiv markierten ungesättigten Fettsäure durchgeführt. Gegenüber der präparativen Gaschromatographie z.B. hat das Isotopenverfahren den Vorzug, daß noch Bruchteile von γ-Mengen exakt erfaßt werden können. Da z.B. 180 mg reine Linolsäure, die am Carboxyl-C-Atom mit ^{14}C markiert ist, z.B. 100 x $1.2 \cdot 10^9$ Impulse (dpm) liefern und 100 dpm noch exakt zu messen sind, wären theoretisch noch 1/100000 γ nachweisbar.

Wir wählten als Testsäure L i n o l s ä u r e , da diese eine relativ hohe Thermostabilität besitzt.

Die aus dem Handel bezogene ^{14}C-markierte Linolsäure wurde zunächst methyliert. Testversuche mit unmarkierter Säure ergaben, daß nach einer Stunde praktisch quantitative Methylierung (unter den gewohnten Bedingungen, durch Kochen mit 6 n-methanolischer HCl) erfolgt war. Die Ausmessung des Methylesters zu nicht umgesetzter freier Säure auf dem Dünnschichtchromatogramm betrug 1681 Impulse zu 24 Impulsen, das sind 98.57% methylierte Fettsäure.

Die Isolierung des erhaltenen Methylesters aus der Platte erfolgte mit Chloroform pro analysi.

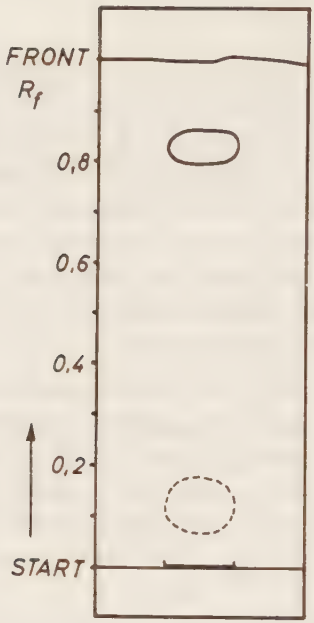


Abb. 40

DC der methylierten Linolsäure-1-^{14}C

Tabelle 21

Gaschromatographie einer radioaktiven Linolsäure

Behandlung der Substanz	einpipettierte Menge µl	Radioaktivität (Anzahl an Impulsen)	Radioaktivität bezogen auf 1 µl (Anz. an Impulsen)	Ausbeute %
Eichwert	4.0	16178	4045	100
Neue Säule 160°	3.7	8266	2234	55.2
	3.65	8384	2295	56.7
	4.0	10971	2743	67.8
Neue Säule 190°	4.8	14392	2998	74.1
	4.65	17682	3802	93.3
Alte Säule 160°	3.5	11523	3292	81.3
	4.8	2870	598	14.78
	4.0	18352	4588	113.4
	4.0	4410	1102	27.2
Alte Säule 190°	4.5	19514	4336	107.1
	4.2	16703	3977	98.3

Die Versuche wurden bei verschiedenen Temperaturen und an zwei Säulen durchgeführt. Es handelte sich in beiden Fällen um eine EGSSX-Säule (15% EGSSX auf Gaschrom P). Die Säulenlänge betrug 2 m, der Durchmesser 0.5 cm. Um den Einfluß von frischem und älterem Säulenmaterial zu studieren, benutzten wir einmal eine Säule, die noch nie für Trennungen verwendet worden war. Mit der zweiten Säule wurden vorher dagegen wiederholte Male Trennungen durchgeführt. Weiterhin prüften wir in beiden Fällen die Substanzverlustquote in Abhängigkeit von der Temperatur. Wir wählten 160° und 190°C. Zum Auffangen des radioaktiven Kohlendioxyds diente jeweils eine Vorlage von 10 ml Hydramin. Die eingespritzte Lösungsmenge betrug für die einzelnen Proben jeweils um 4 µl (genaue Angaben siehe Tabelle 21). Vor Beginn der ersten Einspritzung in den Gaschromatographen mußte ein Blindwert als Bezugswert hergestellt werden. Ca. 4 µl radioaktive Lösung wurden direkt in 10 ml Hydraminlösung eingespritzt

und die Radioaktivität bestimmt. Der erhaltene Wert diente als Bezugswert. Um zu prüfen, ob beim Zwischenschalten des Isotopenmeßgerätes Radioaktivität absorbiert wird, haben wir deshalb zunächst 3 Versuchsanalysen mit und ohne Meßgerät unter sonst gleichen Bedingungen durchgeführt. Dabei war ein erheblicher Verlust festzustellen, so daß wir, nachdem die Retentionszeiten bei den einzelnen Temperaturen ermittelt worden waren, blind auffangen mußten. Nach dem Verdünnen des Hydramins mit der gleichen Menge Scintillatorflüssigkeit konnte die Radioaktivität direkt gemessen werden.

Diskussion der Ergebnisse

Wertet man die Erfahrungen, die bei den Untersuchungen mit radioaktiver Linolsäure gemacht wurden, im Hinblick auf die q u a l i t a t i v e Gaschromatographie von Fettsäuren aus, so muß gesagt werden, daß mit einer frischen oder zumindest nur wenig gebrauchten Säulenfüllung die genauesten Ergebnisse und schärfsten Trenneffekte erhalten werden. Ferner soll die Temperatur so niedrig gehalten werden, daß sie gerade noch eine scharfe Trennung bewirkt.

Ebenso sollte man bei der p r ä p a r a t i v e n Gaschromatographie möglichst neues Säulenmaterial wählen, da sich im Falle der präparativen Trennungen der Verlust an Substanz durch die größeren Säulenausmaße und die damit bedingte höhere Absorptionsfähigkeit des alten Säulenmaterials noch wesentlich vergrößern würde. Vergleicht man die Ergebnisse der präparativen Gaschromatographie, die am Beispiel der Trennung einer Linol- von einer Linolensäure ermittelt wurden mit denen, der im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Untersuchungen, so brachten sie die gleichen Ergebnisse. Die Höhe der Ausbeuten ist abhängig von der Höhe der Temperatur. Die erhaltenen Ausbeuten an Linolsäure betrugen bei der Trennung Linol-Linolensäure durch präparative GC ca. 30%, bei den Versuchen mit radioaktiver Säure ca. 60%.

Der größere Verlust bei der präparativen GC ist durch die größere Absorptionsfähigkeit der größeren Säule zu erklären.

Beim Vergleich der Werte in Abhängigkeit von Temperatur und Säule zeigt sich nur bei der niederen Temperatur (160°C)ein Unterschied zwischen neuer und alter Säule. Die Ausbeuten, die eine neue Säule lieferte, lagen bei Betrachtung der Durchschnittswerte um ca. 25% höher. Bei einer Temperatur von 190°C bestand kein Unterschied in der Höhe der Ausbeute. Gegen Anwendung einer zu hohen Temperatur bei gaschromatographischen Trennungen höher ungesättigter Fettsäuren spricht die Beobachtung, daß ein hoher Polymerisationsgrad auftritt. Vergleicht man unsere Ergebnisse mit den Literaturangaben, so ergibt sich folgendes:

GERSON und SHORLAND[27] benutzten ebenfalls die präparative Gaschromatographie, um eine Linolensäure-Stearinsäuremethylestermischung voneinander zu trennen. Dabei beobachteten die Autoren einen Verlust von 51.4% an Linolensäuremethylester. Beide Autoren machten wie wir die Feststellung, daß der Verlust von der eingesetzten Menge an Linolensäureester abhängt. Je mehr Ester eingesetzt wurde, umso geringer war der Verlust. Aus der gleichen Arbeit geht hervor, daß der Verlust an Substanz mit wachsender Kettenlänge zunimmt. Bei der Trennung einer hydrierten C_{20}-FS von einer C_{22}-FS traten Verluste von 51% bei der C_{20}-FS und 85% bei der C_{22}-FS auf. Die Befunde von GERSON und SHORLAND decken sich somit mit den unsrigen.

Vergleicht man die einzelnen Trennmethoden im Hinblick auf ihre Anwendbarkeit, so ergibt sich, daß die präparative Gaschromatographie für die Trennung von Substanzmengen im Bereich von etwa 10 - 30 mg sehr gut anwendbar ist. Die Kapazität einer Säule von 2 m Länge und 1 cm Durchmesser beträgt maximal 300 µl einer 10%-igen Lösung, so daß 10 bis 15 Einspritzungen nötig sind, um 20 mg Reinsubstanz zu erhalten. Bei Fettsäuremengen unter 10 mg ist aber der Verlust in der Säule so groß, daß hierfür die präparative Gaschromatographie nicht mehr in Betracht kommt und deshalb auf andere Methoden, wie z.B. die präparative Dickschichtchromatographie zurückgegriffen werden muß.

EXPERIMENTELLER TEIL

I. Isolierung der Fettstoffe aus den Samen

Die Samen der untersuchten Boraginaceen und Labiaten lieferte die Firma Bornträger in Offstein. Jeweils 100 g der gemahlenen Droge wurden im Soxhlet bis zur Farblosigkeit des Eluats mit Benzin extrahiert. Das Einengen der Auszüge erfolgte am Rotationsverdampfer.

II. Aufarbeiten des Rohextraktes

Der erhaltene Rohextrakt (jeweils ca. 15 - 16 g aus 100 g Samenmaterial) wurde mit 5%iger methanolischer Kalilauge unter Zusatz von 1.0 g Ascorbinsäure als Oxydationsschutz durch einstündiges Erhitzen am Rückflußkühler auf dem Wasserbad verseift. Nach dem Abkühlen verdünnten wir die Lösung mit der doppelten Menge Wasser und schüttelten den unverseifbaren Anteil dreimal mit etwa 200 ml Benzin aus. Die Benzinausschüttelungen wurden dreimal mit je 100 ml Wasser bis zur neutralen Reaktion gewaschen. Die vereinigten wässrig-methanolischen Auszüge säuerten wir mit Salzsäure auf ca. pH = 2 an und schüttelten die freigesetzten Fettsäuren dreimal mit je 200 ml peroxydfreiem Äther aus. Die Ätherphase wurde säurefrei gewaschen und über Na_2SO_4 sicc. getrocknet. Die Hauptmenge des Lösungsmittels wurde bei 45°C am Rotationsverdampfer und der Rest durch Einblasen von Stickstoff entfernt.

1. Abtrennen der gesättigten Fettsäuren

Wir lösten die Gesamtfettsäuren (jeweils ca. 5 - 7 g) in 50 ml Aceton und entfernten die gesättigten Fettsäuren durch Tiefkühlkristallisation bei -20°C. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Die ausgefallenen Fettsäuren wurden abzentrifugiert. Die zurückgebliebene Menge enthielt die Gesamtmenge der ungesättigten Fettsäuren. Nach Abdampfen

des Acetons unter Stickstoff methylierten wir die Fettsäuren in üblicher Weise mit Diazomethan.

2. Methylierung

Diese erfolgte nach einer von SCHLENK und GELLERMANN[28] angegebenen und von POHL[2] modifizierten Methode. Etwa 1 g ungesättigte Fettsäuren lösten wir in einer Mischung von 27 ml Äther und 3 ml Methanol und leiteten durch diese Lösung frisch aus N-Methyl-N-nitroso-p-toluylnitrosamid (MNSA) bereitetes Diazomethan. Für ca. 1 g Fettsäuren sind etwa 1.5 g MNSA erforderlich.

3. Dünnschichtchromatographie der FS-Methylester

a) Herstellung der paraffin-imprägnierten Kieselgur-Platten
Wir verwendeten Glasplatten der Dimension 12 x 20 cm. 18 g Kieselgur G ("Merck") wurden mit 32 ml Wasser angerieben und diese Suspension mit einem Streichgerät für Dünnschichtplatten gleichmäßig in einer Schichtdicke von etwa 250 µ auf vier Platten aufgetragen. Die Platten wurden anschließend eine Stunde bei 120°C im Trockenschrank aktiviert. Die wieder abgekühlten Platten stellten wir in eine Chromatographiekammer für Dünnschichtchromatographie, in der sich eine Mischung von Petroläther und Paraffin I.R. ("Merck") (9:1) befand. Nachdem das Lösungsmittel das obere Plattenende erreicht hatte, wurden die Platten aus der Kammer genommen und eine Stunde zum vollständigen Abdunsten des Lösungsmittels an der Luft aufbewahrt.

b) Fließmittel
Die Auftrennung der ungesättigten Ester erfolgte im Laufmittelsystem Ameisensäure-Aceton-Acetonitril (2:1:2). Die Kammer wurde vor dem Einstellen der Platte gesättigt. Die Laufzeit betrug bis zu einer Höhe von etwa 16.5 cm 90 Min.

c) Das Sichtbarmachen der Fettsäuren auf den entwickelten trockenen Platten erfolgte durch Einstellen in eine Osmium-

tetroxid- oder Jodkammer. Beim Anfärben mit Osmiumtetroxid entstehen nach etwa 5 Min. stabile schwarze Flecken.

4. Chromatographie der Quecksilber-II-acetat-Addukte

Zur Herstellung der Quecksilberaddukte lösten wir nach JANTZEN-ANDREAS 1.0 g FS-Ester in einer Lösung von 14.0 Quecksilber-II-acetat in 250 ml Methanol, 2.5 ml Wasser und 1 ml Eisessig. Die Lösung blieb 24 Stunden (bei C_{22}-Estern 48 Stdn.) bei Zimmertemperatur im Dunkeln stehen. Nachdem das Lösungsmittel bei 25° bis 30° im Vakuum abgedampft worden war, wurde der Rückstand in 50 ml Chloroform aufgenommen. Nach fünfmaligem Waschen mit je 25 ml Wasser zur Beseitigung des überschüssigen Quecksilberacetates wurde die Lösung über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Abfiltrieren des Natriumsulfats konnte die durch Einblasen von Stickstoff eingeengte Lösung direkt zur Chromatographie verwendet werden.

a) Herstellung der Dünnschichtplatten
Die Platten (12 x 20 cm) wurden nach WAGNER und POHL[25] in einer Dicke von ca. 250 µ mit einer Anschlämmung von 3 g Kieselgel G (Merck) und 7 g Kieselgur (Merck) in 18 cm Wasser bestrichen und dann 90 Minuten bei 55°C getrocknet.

b) Laufmittelsystem
Isobutanol-Ameisensäure-Wasser (100:0.5:15?) wurden in einem Scheidetrichter solange geschüttelt, bis eine klare Flüssigkeit entstanden war. Vor Beginn der Chromatographie war eine 5-stündige Kammersättigung notwendig.

c) Auftragen der Substanz
Die Addukte wurden mit dem Pinsel aufgetragen, um eine Beschädigung der Kieselgel-Kieselgur-Schicht zu vermeiden. Pro Platte können maximal 25 - 30 mg Addukte entsprechend 6 - 8 mg ungesättigte Ester aufgetragen werden. Es ist aber ratsam, nur mit einer Menge von etwa 15 mg zu arbeiten, um jede Überladung der Platten zu vermeiden und eine optimale Trennung zu erreichen. Bei einer Konzentration

von etwa 1 g Addukten in 4 ml Chloroform lassen sich etwa 10 - 20 mg Addukte entsprechend 2 - 5 mg ungesättigte Ester mit einem einzigen Pinselstrich auftragen.

d) Sichtbarmachen

Die Addukte wurden nach dem Abtrocknen der Platten mit dem kalten Föhn mit einer 0.1%igen isobutanolischen Diphenylcarbazonlösung besprüht.

5. Qualitative Gaschromatographie der FS-Methylester

Wir führten die Analysen der ungesättigten Fettsäureester mit einem Gaschromatograph der Firma Packard durch.
Säule (Glas): Länge 2 m; Durchmesser: 0.4 cm.
Trägermaterial war im Falle der FS bei der Boraginaceenuntersuchung Bernsteinsäureäthylenglycolpolyester 15%-ig auf Chromosorb 60 bis 80 mesh.

Für alle weiteren Untersuchungen verwendeten wir Äthylenglykolsuccinatsilikon auf Gaschrom P 15%-ig silikonisiert.
100 - 120 mesh.
Säulentemperatur: 190° bis 195°
Detektortemperatur: 215° bis 218°
Einspritztemperatur: 272 bis 280°
Auslaßtemperatur: 240°
Durchfluß: 60 ml/Minute.
Trägergas: Argon
Papiervorschub: 0.5 cm/Min.
Einspritzmenge: Von einer Verdünnung von 0.025 ml Fettsäureester in 0.2 ml Chloroform wurden 2 µl für eine Bestimmung eingespritzt.

6. Alkaliisomerisierung

2 - 3 mg isolierte Fettsäureester bzw. 5 - 6 mg Fettsäureestergemisch wurden nach HOLMAN und HAYES[3] in einer Spezialapparatur nach POHL[2] der Alkaliisomerisierung unterworfen

Wir lösten die Proben in 0.8 ml einer Mischung aus 0.85 ml GLYKOL-KOH (21% ± 0.1%) und 1 ml Äthanol und erhitzten unter Stickstoff auf 180° ± 0.5°C. Da es sich bei unseren Proben meistens um Monoen-¬Dien-, Trien- und Tetraensäuren handelte, ließen wir diese 20 Minuten lang auf dieser Temperatur. Nach Beendigung der Isomerisation wurden die Proben einschließlich der Blindprobe mit gleichen Mengen Methanol verdünnt (10 - 15 ml) und dann das UV-Spektrum zwischen 240 und 360 mμ gemessen. (Zeiss Spektralphotometer PQ II).

7. Regenerierung der Fettsäuremethylester aus den Quecksilber-II-Addukten

Die auf Dünnschichtplatten aufgetrennten Addukte wurden zur weiteren Identifizierung jeweils wieder zu den Estern regeneriert. Nach dem Besprühen der Platten mit Diphenylcarbazonlösung wurden die Zonen mit einer Nadel markiert und nach dem völligen Abtrocknen im kalten Luftstrom von der Platte eluiert und in einen Erlenmeyerkolben überführt. Die Spaltung der Addukte führten wir nach GLASER und GRIMMER[29] durch. Die Zonen von 8 Platten (12 x 20 cm) wurden mit 18 ml einer 5%igen Lösung von Ammonrhodanid in Methanol und 2.4 ml Salzsäure (37%) versetzt und eine Stunde unter wiederholtem Schütteln im Dunkeln stehen gelassen. Nach dem Verdünnen mit etwa 40 ml Wasser konnten die Ester durch dreimaliges Ausschütteln mit Petroläther isoliert werden. Die Petrolätherphase wurde zweimal mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und nach dem Abfiltrieren desselben die Phase unter Stickstoff abgedampft.

8. Untersuchung der regenerierten FS-Ester auf Reinheit

Die regenerierten FS-Ester wurden dünnschichtchromatographisch im Laufmittelsystem Ameisensäure-Acetonitril-Aceton, wie auf S. 73 berichtet, auf Reinheit geprüft.

a) Hydrierung

Zur Ermittlung der Kettenlänge der regenerierten Ester wurden diese in einer Mikroanlage hydriert. Ca. 5 mg Substanz wurden in 5 ml Tetrahydrofuran gelöst, die vorher mit einer Spatelspitze Platinoxid als Katalysator vorhydriert worden waren (s.S. 6). Die Dauer der Hydrierung betrug ca. 2 Stdn.. Nach dem Abblasen des Lösungsmittels wurde der Rückstand mit 5 ml Benzin aufgenommen und so der Katalysator abgetrennt. Die hydrierten Substanzen wurden gaschromatographisch untersucht.

III. Isolierung der Gesamtlipoide aus grünen Pflanzen oder grünen Pflanzenteilen

Aus den geschnittenen Drogen isolierten wir die Gesamtlipoide durch Extraktion mit Methanol-Chloroform am Rückfluß auf dem Wasserbad. Der erhaltene Rohextrakt wurde, wie auf S. 4 angegeben, weiterverarbeitet.

1. Abtrennen der Farbstoffe

Die Abtrennung der Farbstoffe erfolgte über eine Kieselgelsäule. Verwendet wurde Kieselgel "Merck" (0.2 - 0.5 mm). Für die Reinigung von ca. 2 - 2.5 g farbstoffhaltiger Fettsäuremethylester verwendeten wir eine Glassäule von 35 cm Länge und 2.8 cm Durchmesser. Das Kieselgel wurde mit dem Laufmittel Benzol/Benzin (1:1) angeschlämmt und dann in die Säule eingefüllt. Die methylierten ungesättigten Fettsäuren wurden ebenfalls in Benzol/Benzin gelöst und auf die Säule gebracht. Das Eluieren erfolgte mit der gleichen Lösungsmittelmischung. Das Laufmittel wurde am Rotationsverdampfer bei einer Temperatur von 45°C abgedampft. Die so gewonnenen reinen Ester dienten für alle weiteren Untersuchungen.

2. Strukturermittlung

a) Reduktiver FS-Abbau

Der Abbau wurde bei der C_{20}-Tetraensäure durchgeführt. Hierzu wurden die aus vier Platten regenerierten Ester verwendet (Plattengröße 20 x 20 cm), was einer Estermenge von ca. 5 mg entsprach.

b) Ozonolyse

10 ml Pentan wurden durch Eintauchen des Reaktionskolbens in ein Trockeneisbad (-65°C) und Einleiten von Ozon mit demselben gesättigt. Zur Erzeugung des Ozons verwendeten wir einen Ozonisator der Fa. Hans Neumayer, Freiburg, Modell "Ozonium". Der Sauerstoffdurchfluß wurde auf 415 ml/Min. eingestellt. Eine ausreichende Sättigung des Pentans mit Ozon war erreicht, sobald die Lösung blaue Farbe angenommen hatte. Die Substanz wurde in 0.5 ml Pentan gelöst und der Ozonlösung zugemischt. Nach Beendigung der Ozonisierung, die augenblicklich verläuft, dampften wir das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bei 0°C ab, um überschüssigen Sauerstoff und Ozon zu entfernen.

c) Katalytische Reduktion

Die Ozonide wurden im Reaktionskolben mit 2 ml Methylenchlorid und ca. 15 mg Lindlar-Katalysator bei 0°C versetzt. Nachdem das Gefäßsystem erst mit Stickstoff gespült und dann mit Wasserstoff angefüllt worden war, rührten wir das Gemisch 20 Min. mit einem Magnetrührer. Der Katalysator wurde abfiltriert, das Filter nachgewaschen und dann die Lösung im Stickstoffstrom abgedampft. Wir nahmen die gebildeten Aldehyde in 4 cm Äthanol auf und versetzten die Lösung mit ca. 4 ml Dinitrophenylhydrazin-Reagenz. Die nach 12-stündigem Stehen gebildeten Kristalle wurden mit Hexan ausgeschüttelt (2mal mit 8 - 10 cm). Die Hexanphase wurde einmal mit 10 ml Wasser gewaschen. Nach dem Einengen bis auf etwa 3 ml konnte die Hexanphase direkt chromatographiert werden.

d) Chromatographie der Hydrazone

Die Hydrazone wurden auf Kieselgelplatten, die bis 110° aktiviert worden waren, chromatographiert. Als Laufmittel verwendeten wir Benzol-Benzin (75:25). Die Hydrazone konnten als dunkle Flecken unter dem UV-Licht identifiziert werden.

e) Dinitrophenylhydrazin-Reagenz - D.N.P.H.-Reagenz

50.0 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin wurden in 600 ml 85%-iger ortho-Phosphorsäure durch Erwärmen auf dem Wasserbad gelöst. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung mit 395 ml Äthanol verdünnt und anschließend filtriert.

f) Herstellung eines Katalysators nach Lindlar[31)]

(Palladium-Calciumcarbonat-Katalysator mit 5% Palladium)

50.0 g Calciumcarbonat wurden in 400 ml destilliertes Wasser eingestreut. Dazu gaben wir 50 ml Palladiumchloridlösung (5%-ig). Es wurde zunächst 5 Min. bei Raumtemperatur und dann 10 Min. bei 80° gerührt. Die heiße Aufschlämmung schüttelten wir in einem Hydrierkolben solange mit Wasserstoff, bis keine Wasserstoffaufnahme mehr stattfand. Es wurde abgenutscht und mit destilliertem Wasser gründlich ausgewaschen. Der Nutschkuchen mußte sodann kräftig bis zur vollständigen Suspension gerührt werden. Hierauf gaben wir eine Lösung von 5 g Blei-II-Acetat in 10 ml destilliertem Wasser zu, rührten 10 Min. bei 20°C und anschließend 40 Min. auf dem siedenden Wasserbad. Der Katalysator wurde abgenutscht, mit destilliertem Wasser gründlich nachgewaschen und im Vakuum bei 40 bis 45°C getrocknet.

g) Oxidativer Abbau

Nach der Vorschrift von KLENK-BONGARD[5)] wurden 10 mg Fettsäureester in 0.5 ml Eisessig und 1 ml Äthylacetat gelöst und dann bei 0°C ozonisiert. Nach 40stündigem Stehenlassen bei 35°C und kurzem Aufkochen destillierten wir das Lösungsmittel ab. Wir verwendeten hier zur Erzeugung des Ozons den gleichen Ozonisator, wie es auf S. 78 (reduktiver Abbau) beschrieben worden ist. Der Sauerstoffdurchfluß betrug 415 ml/Min. Die

Menge an Ozon war ausreichend, sobald sich eine schwefelsaure Kaliumjodidlösung gelb gefärbt hatte.

h) Methylierung der Abbausäuren

Die Abbausäuren wurden mit einer Lösung von Bortrifluorid (140 g) in wasserfreiem Methanol (1000 ml) methyliert. Aus einer Vorratsbombe leiteten wir mit Hilfe eines Glasrohres solang Bortrifluorid ein, bis das Methanol 140 g aufgenommen hatte (Abzug).

Durchführung:

1 g Fettsäuren werden in einem 500 ml Schütteltrichter in 20 ml methanolischer BF_3-Lösung aufgenommen und die Lösung 15 Min. bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Anschließend hydrolysierten wir mit 30 ml $CHCl_3$ kräftig durch. Nach der Trennung der Phasen wurde die $CHCl_3$-Schicht abgelassen und mit Wasser säurefrei gewaschen, über Na_2SO_4 sicc. getrocknet, filtriert und im Vakuum bei 35°C abgedampft.

Die Chromatographie dieser Ester wurde wie auf S. 73 beschrieben, durchgeführt.

IV. Präparative Gaschromatographie

1. Ungesättigte Fettsäuren

Wir verwendeten für unsere Untersuchungen einen Gaschromatographen Modell Aerograph "Autoprep" A - 700 mit einem Hitzdraht-Detektor und einem Honeywell-Brown-Kompensationsschreiber vom Typ Electronic. Hersteller: Wilkens Instrument u. Research Inc. California, USA.

Säulen: Spiralig gebogene Aluminiumsäulen mit 9.6 mm Innendurchmesser und 2 m Länge.

Trägermaterial: EGSSX (15%-Äthylenglykol-Succinat-Silicon) auf Gaschrom P 100 - 120 mesh

Temperaturen:

Säule	Detektor	Einlaß	Auslaß
185°	212°	230°	230°
175°	215°	235°	235°

Gasdurchfluß: 60 ml/Min.
Papiervorschub: 5 Min/inch
Einspritzmenge: 100 - 200 ml = 10 - 20 mg gelöst in $CHCl_3$ p.a.
Die Fraktionen wurden in Spezialgläsern, die mit Gummistopfen versehen sind, gesammelt. Die Kühlung erfolgte in einer Mischung von Trockeneis in Methanol.

Imprägnierung des Trägermaterials:
Das Trägermaterial wurde zunächst mit stationärer Phase, die in Methylenchlorid gelöst war, zu einem Brei verrührt. Darauf wurde das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer bei schneller Umdrehung beseitigt. Zur vollständigen Entfernung des Lösungsmittels wurde das imprägnierte Trägermaterial in dünner Schicht 24 Stdn. im Vakuumtrockenschrank bei 100°C erhitzt. Die gepackte Säule wurde zwei Tage unter Gasdurchfluß bei einer Temperatur, die 10% über der Betriebstemperatur der Säule lag, konditioniert.

V. Gaschromatographie einer radioaktiven Fettsäure

Wir verwendeten dazu einen Gaschromatographen Modell Packard, Digital Programmer 845. (Elektrometer Modell 840, der an einen Packard Tri-Carb, Combustion Furnace, Modell 325, angeschlossen war).
Säule (Glas): 2 m x 0.5 cm
Trägermaterial: EGSSX- (15% Äthylenglycol-Succinat-Silicon) auf Gaschrom P (100 - 120 mesh)
Säulentemperatur: 160 und 190°C
Detektortemperatur: 215°
Strömungsgeschwindigkeit: 90 ml/Min.
Papiervorschub: 0.5 cm/Min.
Trägergas: Argon

Methylierung einer ^{14}C-markierten Linolsäure
10 mg Linolsäure wurden in 10 ml 6 n-methanolischer HCl gelöst und am Rückflußkühler erhitzt. In Zeitabständen von

jeweils einer halben Stunde sind kleine Proben entnommen worden, die auf Kieselgelplatten im Laufmittelsystem (Benzin-Äther 7:3) chromatographiert wurden. Die methylierte Substanz lief fast an der Laufmittelfront (Abb. 41).

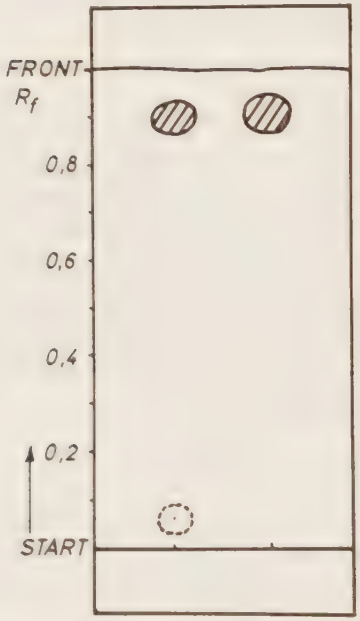


Abb. 41

DC des ^{14}C markierten Linolsäuremethylesters

Für unsere Untersuchungen wählten wir eine Verdünnung von 0.05 ml Linolsaure in 5 ml Lösungsmittel, von der 0.005 ml für die Bestimmungen selbst dienten. Die Radioaktivität betrug ca. 100µc in 2 ml. Um die Fehlerquellen möglichst klein zu halten, wurde die markierte Linolsäure mit 10 mg unmarkierter gemischt und die Mischung zusammen mit 6-n methanolischer HCl methyliert. Nach genau einer Stunde entnahmen wir eine kleine Probe, chromatographierten diese, wie oben beschrieben. Dem Chromatogramm nach war die Substanz vollständig methyliert. Zur genauen Bestätigung wurde die Radio-

aktivität der beiden Flecken, einer direkt über dem Start und ein intensiv braun gefärbter, fast an der Front, mit dem Geigerzähler ausgemessen.

VI. Radioaktivitätsmessung

0.05 ml einer 1%igen ^{14}C-markierten Linolsäurelösung (100 µC in 2 ml) wurden mit 10 mg Linolsäure*) gemischt und in 0.5 ml Chloroform p.a. gelöst.
Eingespritzte Menge dieser Lösung ca. 4 µl. Nach dem Durchgang durch den Gaschromatographen wurde das aus der Linolsäure entstandene markierte CO_2 in 10 ml Hydramin aufgefangen und nach dem Verdünnen mit der gleichen Menge Scintillatorflüssigkeit**) in einem Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer Modell 3004 bei folgender Einstellung gemessen:

Kanal A-B	gain 55%	window 65-1000
C-D	gain 55%	window 65-500
E-F	gain 55%	window 310-1000 = 50% cpm vom Kanal A-B

Die Meßzeit betrug 5 Minuten.

*) Herkunft: Radiochemical Centre, Amersham-Buckinghamshire, England.- Reinheit: 98% reine Linolsäure, Garantie auf 99% an Radioaktivität.

**) Scintillatorflüssigkeit: 0.5 g Dimethyl POPOP, 5 g PPO, 1000 ml Toluol p.a.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1) JANTZEN E., H.ANDREAS, Chem.Ber. 92, 1427 (1959)
2) WAGNER H. u. P.POHL, Biochem.Z. 340, 337 (1964)
3) HOLMAN R.T., H.HAYES, Analyt.Chem. 30, 1422 (1958)
4) PRIVETT O.S., M.L.BLANK, O.ROMANUS, J.Lipid Research 4, 260 (1963)
5) KLENK E., W.BONGARD, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 290, 181 (1952)
6) KAUFMANN H.P., Chem.Ber. 81, 159 (1948)
7) SCHLENK H., J.L.GELLERMANN, J.Amer.Oil Chem.Soc. 42, 504 (1965)
8) WAGNER H. u. H.KÖNIG, Biochem.Z. 339, 212 (1963)
9) KLEIMAN R., F.R.EARLE, J.A.WOLFF, J.Amer.Oil Chem.Soc. 41, 459 (1964)
10) SMITH C.R., J.R.J.W.HAGEMANN, J.S.WOLFF, J.Amer.Oil Chem. Soc. 41, 290 (1964)
11) ARPINO A., Riv.Ital.Sostanze Grasse 38, 275 (1961)
12) YUKAGAKU, Ind.R.Inst. 10, 174 (1962)
13) SCHLENK H., J.Amer.Oil Chem.Soc. 38, 728 (1961)
14) KLENK E., D.EBERHAGEN, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 307, 42 (1957)
15) KLENK E. u. H.J.TOMUSCHAT, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 308, 165 (1957)
16) KLENK E. u. H.STEINBACH, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 316, 31 (1959)
17) KLENK E. u. L.BRUCKER-VOIGT, Hoppe-Seyler's Z.physiol. Chem. 324, 1 (1961)
18) KLENK E., D.EBERHAGEN u. H.P.KOCH, Hoppe-Seyler's Z.physiol. Chem. 334, 44 (1963)
19) KLENK E. u. H.DEBUCH, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 286, 33 (1950)
20) KLENK E. u. A.DREIKE, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 300, 113 (1955)
21) AHRENS E.H. u. L.C.CRAIG, J.biol.Chemistry 185, 299 (1950)
22) HOWARD G.A. u. A.J.P.MARTIN, Biochem.J. 46, 532 (1950)
23) HOFMANN R., Dissertation Hamburg
24) ZÖLLNER N. u. D.EBERHAGEN, Untersuchung u.Bestimmung der Lipoide im Blut, Springer-Verlag, S. 148 (1965)
25) WAGNER H. u. P.POHL, Biochem.Z. 340, 337 (1964)
26) KLENK E., W.MONTAG, Liebigs Ann.Chem. 604, 4 (1957)
27) GERSON T., F.B.SHORLAND, Biochem.J. 91, 11c (1964)
28) SCHLENK H. u. J.L.GELLERMANN, Analyt.Chem. 32, 1412 (1960)
29) GLASER A. u. G.GRIMMER, Biochem.Z. 336, 274 (1962)
30) JOHNSON G.D., J.Amer.Chem.Soc. 73, 5888 (1951)
31) LINDLAR H., Helvet.chim.acta 35, 446 (1952)

L e b e n s l a u f

Am 3.8.1937 wurde ich, Barbara, Helga Friedrich, als Tochter des Ingenieurs Herbert Friedrich und seiner Ehefrau Berta geb. Koth, in Leipzig geboren.

Infolge des Krieges zogen wir 1943 von dort nach Baden-Oos. Nach vierjährigem Besuch der Volksschulen in Baden-Oos (1943-1944) in Landsberg am Lech (1944 bis zum Umsturz 1945) und in Roßhaupten im Allgäu (1946-1947), wechselte ich im September 1947 an die Oberrealschule in Füssen im Allgäu über, wo ich im Juni 1956 die Reifeprüfung bestand.

Meine zweijährige Praktikantenzeit in der Bahnhof-Apotheke in Füssen beschloß ich mit dem pharmazeutischen Vorexamen, das ich im September 1958 in Augsburg ablegte. Anschließend studierte ich vom Winter-Semester 1958/59 ab an der Universität Erlangen Pharmazie, von wo ich nach zwei Semestern an die Universität München überwechselte. Hier bestand ich im Winter-Semester 1961/62 das Pharmazeutische Staatsexamen. Danach war ich 1 Jahr und 3 Monate in der Bahnhof-Apotheke in Füssen tätig. Meine Bestallung als Apothekerin erhielt ich am 1. Juli 1963.

Vom November 1963 bis Juni 1967 war ich mit der Ausarbeitung meiner Dissertation unter Leitung von Professor Dr. H. Wagner beschäftigt. Vom Februar 1964 bis Dezember 1967 verwaltete ich am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre die Stelle einer wissenschaftlichen Assistentin.